

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平11-507031

(43)公表日 平成11年(1999)6月22日

(51)Int.Cl.⁶
C 07 C 381/12
A 61 K 9/127
31/70
C 07 K 5/04
7/06

識別記号
ADY

F I
C 07 C 381/12
A 61 K 9/127
31/70
C 07 K 5/04
7/06

F
ADY

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 69 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平9-500592
(86) (22)出願日 平成8年(1996)5月17日
(85)翻訳文提出日 平成9年(1997)12月8日
(86)国際出願番号 PCT/US96/07121
(87)国際公開番号 WO96/40627
(87)国際公開日 平成8年(1996)12月19日
(31)優先権主張番号 08/480, 203
(32)優先日 1995年6月7日
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 08/480, 204
(32)優先日 1995年6月7日
(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ジェンープローブ・インコーポレーテッド
アメリカ合衆国カリフォルニア州92121,
サン・ディエゴ, ジネティク・センター・
ドライブ 10210
(72)発明者 スリドハール, シー・ナガラジャ
アメリカ合衆国カリフォルニア州93065,
シミ・ヴァリー, イースト・ラーチ・スト
リート 1911
(72)発明者 ダッタガブタ, ナニブフシャン
アメリカ合衆国カリフォルニア州92130,
サン・ディエゴ, カーウッド・コート
4221
(74)代理人 弁理士 社本 一夫 (外5名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】チオカチオン性脂質、医薬組成物およびその使用方法

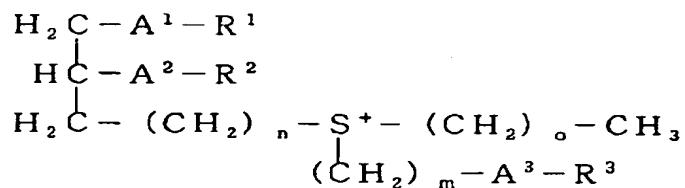
(57)【要約】

カチオン性の電荷を有する脂質分子が記載される。これらのカチオン性脂質は、生体分子、例えばオリゴヌクレオチド、核酸、ペプチド、診断イメージング剤、蛋白質および薬剤分子の送達に有用である。リポソームの形態において、これらは治療または診断目的での生体分子の細胞内送達に効率的に用いることができる。

【特許請求の範囲】

1. 生体分子の細胞内への移送を容易にするための化合物であって、一般式

:



[式中、

A^1 および A^2 は、同一または異なり、 $-\text{O}-\text{C}\text{O}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{C}\text{O}-$ または $-\text{S}-$ であり；

A^3 は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{C}\text{O}-$ 、 $-\text{C}\text{O}-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{C}\text{O}-$ 、 $-\text{C}\text{O}-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-\text{C}\text{S}-$ 、 $-\text{C}\text{S}-\text{O}-$ 、 $-\text{C}\text{O}-\text{N}\text{H}-$ 、 $-\text{N}\text{H}-\text{C}\text{O}-$ 、 $-\text{C}\text{S}-\text{N}\text{H}-$ 、 $-\text{N}\text{H}-\text{C}\text{S}-$ 、 $-\text{N}\text{H}-\text{C}\text{O}-\text{O}-$ 、 $-\text{N}\text{H}-\text{C}\text{O}-\text{N}\text{H}-$ 、 $-\text{O}-\text{C}\text{O}-\text{N}\text{H}-$ 、または存在せず；

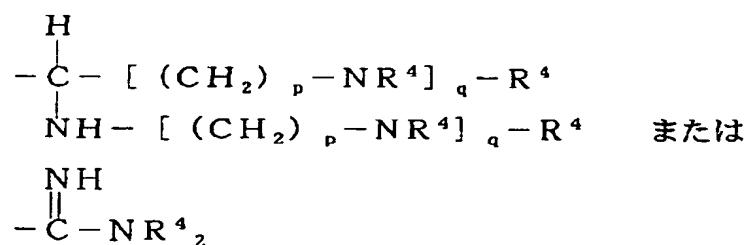
R^1 および R^2 は、同一または異なり、H、または C_1 から C_{23} の飽和または一部不飽和のアルキルまたはアラルキルであり、ただし、 R^1 および R^2 の少なくとも1つはHではなく；

R^3 は、 C_1 から C_{12} のアルキル、アラルキル、アルカリール、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールであり；または

R^3 は、アミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドまたはペントペプチドであり；または

R^3 は、 $-[(\text{CH}_2)_p-\text{N}\text{R}^4]_q-\text{R}^4$ 、

$- (\text{CH}_2)_p-\text{N}\text{R}^4_3 +$ 、



(式中、 p は1から5であり、 q は0から4であり、および R^4 は、HまたはC₁からC₄のアルキルである)であり；および
 m 、 n および o は0から8であり、ただし、 $m \geq 1$ であり、かつ $(m+n+o) \geq 3$ である]

で表される化合物およびその光学異性体および／または塩。

2. 式中、

- a) A^1 および A^2 は、それぞれ独立して、 $-O-$ 、 $-O-CO-$ および $-S-$ からなる群より選択され；
- b) R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、
 - i) 飽和または一部不飽和のC₂—C₂₄の炭化水素基、
 - ii) ベンジル、および
 - iii) フェネチル
 からなる群より選択され；
- c) A^3 は、 $-O-$ 、 $CO-O-$ 、 $-S-$ および $-NH-CO-$ からなる群より選択されるか、または存在せず；
- d) R^3 は、
 - i) 飽和または一部不飽和のC₁—C₁₂のアルキルまたはアラルキル、
 - ii) $-[(CH_2)_p-NR^4]_q-R^4$ (式中、 p は3—4であり、 q は0—4であり、 R^4 はHである)、
 - iii) $-(CH_2)_p-NR^{4_3+}$ (式中、 p は2—3であり、および R^3 はメチルである)、および
 - iv)
$$\begin{array}{c} NH \\ || \\ -C-NR^{4_2} \end{array}$$
 (式中、 R^4 はメチルである)

からなる群より選択される、請求項1記載の化合物。

3. 式中、

- a) R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、
 - i) 飽和または一部不飽和のC₂—C₂₄のアルキル基、および
 - ii) ベンジル；

からなる群より選択され；

- b) A^3 は、 $-O-$ であり；
- c) $n = 0 - 8$ であり；
- d) $o = 0 - 8$ であり；
- e) $m = 1$ から 23 であり；および
- f) R^3 は、 $- [(C_2H_2)_p - NR^4]_q - R^4$ である、請求項2記載の化合物。

4. 式中、

- a) R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、
- i) 飽和または一部不飽和の C_{18} アルキル基、
- ii) 飽和または一部不飽和の C_{16} アルキル基、および
- iii) ベンジル、

からなる群より選択され、かつ $m = 6$ である、請求項3記載の化合物。

5. 式中、

- a) A^1 および A^2 は、両方とも $-O-$ であり；
- b) R^1 は、飽和 C_{16} または C_{18} のアルキル基であり、 R^2 はベンジル基であり；
- c) $n = 0$ であり；
- d) $o = 0$ であり；
- e) $q = 0$ であり；および
- f) R^4 は H である、請求項4記載の化合物。

6. 式中、

- a) R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、
- i) 飽和または一部不飽和の $C_2 - C_{24}$ のアルキル基、および
- ii) ベンジルであり；

からなる群より選択され；

- b) A^3 は $-CO-O-$ であり；
- c) $n = 0 - 8$ であり；

d) $o = 0 - 8$ であり；
 e) $m = 1$ から 23 であり；および
 g) R^3 は、 $- [(C_2H_5)_p - NR^4]_q - R^4$ である、請求項2記載の化合物。

7. 式中、

a) R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、
 i) 飽和または一部不飽和の C_{18} アルキル基、
 ii) 飽和または一部不飽和の C_{16} アルキル基、および
 iii) ベンジル、

からなる群より選択され、および $m = 5$ である、請求項6記載の化合物。

8. 式中、

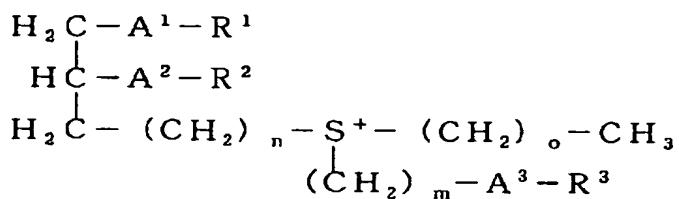
a) A^1 および A^2 は、両方とも $-O-$ であり；
 b) R^1 は、飽和 C_{16} または C_{18} のアルキル基であり、および R^2 はベンジル基であり；
 c) $n = 0$ であり；
 d) $o = 0$ であり；
 e) $q = 0$ であり；および
 f) R^4 は H である、請求項7記載の化合物。

9. 式中、

a) A^1 および A^2 は、両方とも $-O-$ であり；
 b) R^1 および R^2 は、それぞれ、飽和 C_{16} または C_{18} のアルキル基であり；
 c) $n = 0$ であり；
 d) $o = 0$ であり；
 e) $q = 0$ であり；および
 f) R^4 は H である、請求項4記載の化合物。

10. 少なくとも 1 つの生体分子を細胞内に導入する方法であって、

a) 生体分子および次の一般式の少なくとも 1 つのチオカチオン性脂質およびその光学異性体および／または塩：



[式中、

A^1 および A^2 は、同一または異なり、 $-\text{O}-\text{CO}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{CO}-$ または $-\text{S}-$ であり；

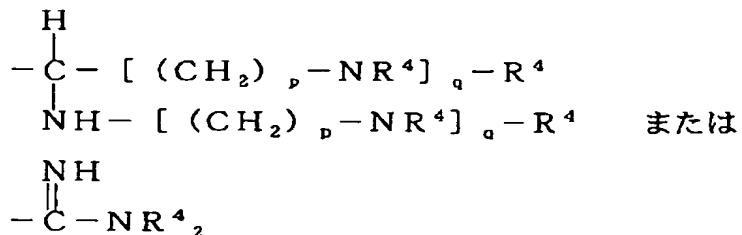
A^3 は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CO}-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CO}-\text{S}-$ 、 $-\text{CS}-\text{O}-$ 、 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CS}-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CS}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-$ 、または存在せず；

R^1 および R^2 は、同一または異なり、H、または C_1 から C_{23} の飽和または一部不飽和のアルキルまたはアラルキルであり、ただし、 R^1 および R^2 の少なくとも 1 つは H ではなく；

R^3 は、 C_1 から C_{12} のアルキル、アラルキル、アルカリール、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールであり；または

R^3 は、アミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドまたはペプチドであり；または

R^3 は、 $-[(\text{CH}_2)_p-\text{NR}^4]_q-\text{R}^4$ 、
 $- (\text{CH}_2)_p-\text{NR}^4_3 +$ 、



(式中、 p は 1 から 5 であり、 q は 0 から 4 であり、および R^4 は H または C_1 から C_4 のアルキルである) であり；および

m 、 n および o は 0 から 8 であり、ただし、 $m \geq 1$ でありかつ $(m+n+o) \geq$

3である]

を含む医薬組成物を用意し、そして

b) 細胞を前記医薬組成物と接触させ、このことにより前記チオカチオニン性脂質が1またはそれ以上の前記生体分子を前記細胞に導入することを容易にする；

の各工程を含む方法。

1 1. 前記チオカチオニン性脂質がリポソーム中に含まれる、請求項10記載の方法。

1 2. 前記チオカチオニン性脂質において、

a) A^1 および A^2 は、それぞれ独立して、 $-O-$ 、 $-O-CO-$ および $-S-$ からなる群より選択され；

b) R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、

i) 飽和または一部不飽和の C_2-C_{24} の炭化水素基、

ii) ベンジル、および

iii) フェネチル

からなる群より選択され；

c) A^3 は、 $-O-$ 、 $-CO-O-$ 、 $-S-$ および $-NH-CO-$ からなる群より選択されるか、または存在せず；

d) R^3 は、

i) 飽和または一部不飽和の C_1-C_{12} のアルキルまたはアラルキル、

ii) $-[(CH_2)_p-NR^4]_q-R^4$ (式中、 p は 3-4 であり、 q は 0-4 であり、および R^4 は H である)、

iii) $-(CH_2)_p-NR^{43+}$ (式中、 p は 2-3 であり、および R^3 はメチルである)、および

iv) $\begin{array}{c} NH \\ || \\ -C-NR^{42} \end{array}$ (式中、 R^4 はメチルである)、

からなる群より選択される、請求項10記載の方法。

1 3. 前記チオカチオニン性脂質において、

a) R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、
 i) 飽和または一部不飽和の $C_2 - C_{24}$ のアルキル基、および
 ii) ベンジル
 からなる群より選択され；
 b) A^3 は、 $-O-$ であり；
 c) $n = 0 - 8$ であり；
 d) $o = 0 - 8$ であり；
 e) $m = 1$ から 23 であり；および
 f) R^3 は、 $-[(CH_2)_p - NR^4]_q - R^4$ である、請求項12記載の方法
 。

14. 前記チオカチオン性脂質において、

a) R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、
 i) 飽和または一部不飽和の C_{18} アルキル基、
 ii) 飽和または一部不飽和の C_{16} アルキル基、および
 iii) ベンジル、

からなる群より選択され、および $m = 6$ である、請求項13記載の方法。

15. 前記チオカチオン性脂質において、

a) A^1 および A^2 は、両方とも $-O-$ であり；
 b) R^1 は、飽和 C_{16} または C_{18} のアルキル基であり、および R^2 はベンジル基であり；
 c) $n = 0$ であり；
 d) $o = 0$ であり；
 e) $q = 0$ であり；および
 f) R^4 は H である、請求項14記載の方法。

16. 前記チオカチオン性脂質において、

a) R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、
 i) 飽和または一部不飽和の $C_2 - C_{24}$ のアルキル基、および
 ii) ベンジル

からなる群より選択され；

b) A^3 は、 $-CO-O-$ であり；

c) $n = 0 - 8$ であり；

d) $o = 0 - 8$ であり；

e) $m = 1$ から 23 であり；および

g) R^3 は、 $-[(CH_2)_p-NR^4]_q-R^4$ である、請求項12記載の方法。

17. 前記チオカチオン性脂質において、

a) R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、

i) 飽和または一部不飽和の C_{18} アルキル基、

ii) 飽和または一部不飽和の C_{16} アルキル基、および

iii) ベンジル

からなる群より選択され、および $m = 5$ である、請求項16記載の方法。

18. 前記チオカチオン性脂質において、

a) A^1 および A^2 は、両方とも $-O-$ であり；

b) R^1 は、飽和 C_{16} または C_{18} のアルキル基であり、および R^2 は、ベンジル基であり；

c) $n = 0$ であり；

d) $o = 0$ であり；

e) $q = 0$ であり；および

f) R^4 は H である、請求項17記載の方法。

19. 前記チオカチオン性脂質において、

a) A^1 および A^2 は、両方とも $-O-$ であり；

b) R^1 および R^2 は、それぞれ、飽和 C_{16} または C_{18} のアルキル基であり；

c) $n = 0$ であり；

d) $o = 0$ であり；

e) $q = 0$ であり；および

f) R^4 は H である、請求項14記載の方法。

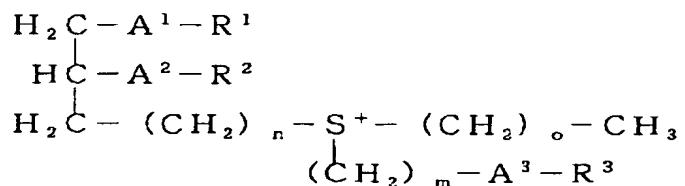
20. 前記生体分子がオリゴヌクレオチドである、請求項10記載の方法。

21. 動物細胞中にオリゴヌクレオチドを導入する方法であって、

a) 前記オリゴヌクレオチドおよびチオカチオン性脂質を含む医薬組成物を用意し、そして

b) 前記細胞を前記医薬組成物と接触させ、このことにより前記チオカチオン性脂質は前記オリゴヌクレオチドの前記細胞中への取り込みを容易にする、の各工程を含む方法。

22. 少なくとも1つの生体分子と、次の一般式：



[式中、

A^1 および A^2 は、同一または異なり、 $-\text{O}-\text{CO}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{CO}-$ または $-\text{S}-$ であり；

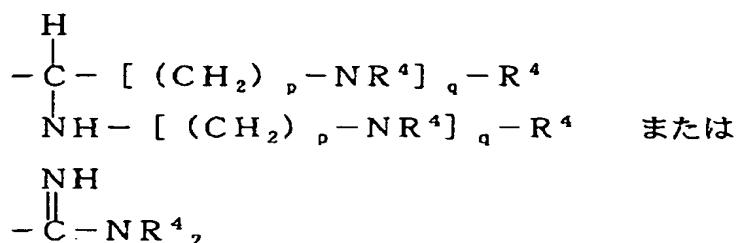
A^3 は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CO}-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CO}-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-\text{CS}-$ 、 $-\text{CS}-\text{O}-$ 、 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CS}-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CS}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-$ 、または存在せず；

R^1 および R^2 は、同一または異なり、H、または C_1 から C_{23} の飽和または一部不飽和のアルキルまたはアラルキルであり、ただし、 R^1 および R^2 の少なくとも1つはHではなく；

R^3 は、 C_1 から C_{12} のアルキル、アラルキル、アルカリール、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールであり；または

R^3 は、アミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドまたはペプチドであり；または

R^3 は、 $-[(\text{CH}_2)_p-\text{NR}^4]_q-\text{R}^4$ 、
 $- (\text{CH}_2)_p-\text{NR}^4_3 +$ 、



(式中、pは、1から5であり、qは、0から4であり、およびR⁴は、HまたはC₁からC₄のアルキルである)である；および

m、nおよびoは0から8であり、ただし、m≥1でありかつ(m+n+o)≥3である]

の少なくとも1つのチオカチオン性脂質およびその光学異性体および／または塩とのコンジュゲートを含む組成物。

23. 前記生体分子がオリゴヌクレオチドである、請求項22記載の組成物。

24. 前記コンジュゲートの前記チオカチオン性脂質部分において、

a) A¹およびA²は、それぞれ独立して、-O-、-O-CO-および-S-からなる群より選択され；

b) R¹およびR²は、それぞれ独立して、

i) 飽和または一部不飽和のC₂-C₂₄の炭化水素基、

ii) ベンジル、および

iii) フェネチル

からなる群より選択され；

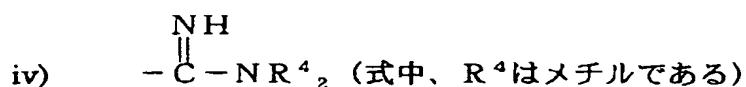
c) A³は、-O-、CO-O-、-S-および-NH-CO-からなる群より選択されるか、または存在せず；

d) R³は、

i) 飽和または一部不飽和のC₁-C₁₂のアルキルまたはアラルキル、

ii) -[(CH₂)_p-NR⁴]_q-R⁴ (式中、pは3-4であり、qは0-4であり、およびR⁴はHである)、

iii) -(CH₂)_p-NR⁴₃₊ (式中、pは2-3であり、およびR³はメチルである)、および



からなる群より選択される、請求項22記載の組成物。

25. 前記コンジュゲートの前記チオカチオン性脂質部分において、

- a) R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、
- i) 飽和または一部不飽和の $\text{C}_2 - \text{C}_{24}$ のアルキル基、および
- ii) ベンジル

からなる群より選択され；

- b) A^3 は、 $-\text{O}-$ であり；
- c) $n = 0 - 8$ であり；
- d) $o = 0 - 8$ であり；
- e) $m = 1$ から 23 であり；および
- f) R^3 は、 $-[(\text{CH}_2)_p-\text{N}\text{R}^4]_q-\text{R}^4$ である、請求項24記載の組成物。

26. 前記コンジュゲートの前記チオカチオン性脂質部分において、

- a) R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、
- i) 飽和または一部不飽和の C_{18} アルキル基、
- ii) 飽和または一部不飽和の C_{16} アルキル基、および
- iii) ベンジル、

からなる群より選択され、および $m = 6$ である、請求項25記載の組成物。

27. 前記コンジュゲートの前記チオカチオン性脂質部分において、

- a) A^1 および A^2 は、両方とも $-\text{O}-$ であり；
- b) R^1 は、飽和 C_{16} または C_{18} のアルキル基であり、および R^2 は、ベンジル基であり；
- c) $n = 0$ であり；
- d) $o = 0$ であり；
- e) $q = 0$ であり；および
- f) R^4 は H である、請求項26記載の組成物。

28. 前記コンジュゲートの前記チオカチオン性脂質部分において、

a) R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、
 i) 飽和または一部不飽和の $C_2 - C_{24}$ のアルキル基、および
 ii) ベンジル
 からなる群より選択され；
 b) A^3 は、 $-CO-O-$ であり；
 c) $n = 0 - 8$ であり；
 d) $o = 0 - 8$ であり；
 e) $m = 1$ から 23 であり；および
 g) R^3 は、 $-[(CH_2)_p-NR^4]_q-R^4$ である、請求項24記載の組成物。

29. 前記コンジュゲートの前記チオカチオン性脂質部分において、
 a) R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、
 i) 飽和または一部不飽和の C_{18} アルキル基、
 ii) 飽和または一部不飽和の C_{16} アルキル基、および
 iii) ベンジル、
 からなる群より選択され、および $m = 5$ である、請求項28記載の組成物。

30. 前記コンジュゲートの前記チオカチオン性脂質部分において、
 a) A^1 および A^2 は、両方とも $-O-$ であり；
 b) R^1 は、飽和 C_{16} または C_{18} のアルキル基であり、および R^2 は、ベンジル基であり；
 c) $n = 0$ であり；
 d) $o = 0$ であり；
 e) $q = 0$ であり；および
 f) R^4 は H である、請求項29記載の組成物。

31. 前記コンジュゲートの前記チオカチオン性脂質部分において、
 a) A^1 および A^2 は、両方とも $-O-$ であり；
 b) R^1 および R^2 は、それぞれ、飽和 C_{16} または C_{18} のアルキル基であり；
 c) $n = 0$ であり；
 d) $o = 0$ であり；

e) $q = 0$ であり；および

f) R^4 は H である、請求項 2 6 記載の組成物。

3 2. 前記オリゴヌクレオチドおよび前記チオカチオン性脂質が、共有結合により結合して前記コンジュゲートを形成する 2 つの成分を含む、請求項 2 3 記載の組成物。

3 3. 前記結合が前記成分の一方の N-ヒドロキシスクシネート基と他方の成分のアミノ基との反応により形成される、請求項 3 2 記載の組成物。

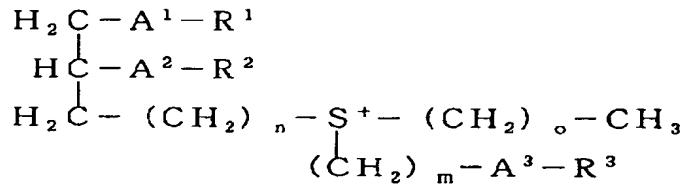
3 4. 薬学的に許容される配合物中に含まれる前記コンジュゲートをさらに含む、請求項 2 3 記載の組成物。

3 5. 少なくとも 1 つの生体分子と少なくとも 1 つのチオカチオン性脂質とのコンジュゲートを含む組成物。

3 6. 少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドと少なくとも 1 つのチオカチオン性脂質とのコンジュゲートを含む治療用組成物。

3 7. 少なくとも 1 つの生体分子を細胞内に導入する方法であって、

a) 次の一般式：



[式中、

A^1 および A^2 は、同一または異なり、 $-\text{O}-\text{CO}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{CO}-$ または $-\text{S}-$ であり；

A^3 は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CO}-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CO}-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-\text{CS}-$ 、 $-\text{CS}-\text{O}-$ 、 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CS}-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CS}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-$ 、または存在せず；

R^1 および R^2 は、同一または異なり、H または C_1 から C_{23} の飽和または一部不

飽和のアルキルまたはアラルキルであり、ただし、 R^1 および R^2 の少なくとも 1

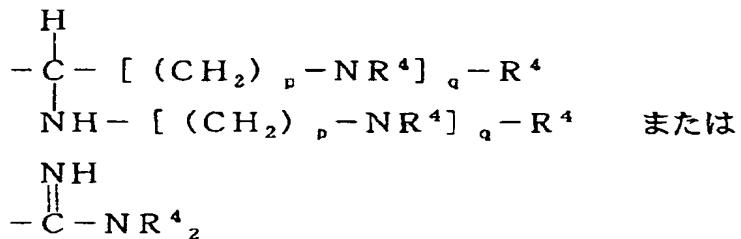
つはHではなく；

R^3 は、C₁からC₁₂のアルキル、アラルキル、アルカリール、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールであり；または

R^3 は、アミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドまたはペプチドであり；または

R^3 は、 $-[(CH_2)_p-NR^4]_q-R^4$ 、

$- (CH_2)_p-NR^{4_3+}$ 、



(式中、pは1から5であり、qは0から4であり、および R^4 はHまたはC₁からC₄のアルキルである)であり；および

m、nおよびoは0から8であり、ただし、 $m \geq 1$ でありかつ $(m+n+o) \geq 3$ である]

の少なくとも1つのチオカチオン性脂質およびその光学異性体および／または塩に連結した少なくとも1つの生体分子を含むコンジュゲートを含む医薬組成物を用意し；そして

b) 前記医薬組成物を前記細胞と接触させて、前記生体分子の前記細胞内への送達を容易にする、

の各工程を含む方法。

38. 前記コンジュゲートがリポソーム中に含まれる、請求項2記載の方法。

39. 前記コンジュゲートの前記チオカチオン性脂質部分において、

a) A¹およびA²は、それぞれ独立して、-O-、-O-CO-および-S-からなる群より選択され；

b) R¹およびR²は、それぞれ独立して、

i) 飽和または一部不飽和のC₂-C₂₄の炭化水素基、

ii) ベンジル、および

iii) フェネチル

からなる群より選択され；

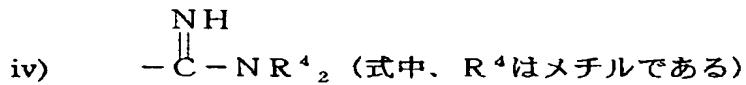
c) A^3 は、 $-O-$ 、 $-CO-O-$ 、 $-S-$ および $-NH-CO-$ からなる群より選択されるか、または存在せず；

d) R^3 は、

i) 飽和または一部不飽和の C_1-C_{12} のアルキルまたはアラルキル、

ii) $-[(CH_2)_p-NR^4]_q-R^4$ (式中、 p は 3-4 であり、 q は 0-4 であり、 および R^4 は H である)、

iii) $- (CH_2)_p-NR^4_3 +$ (式中、 p は 2-3 であり、 および R^3 は メチルである)、 および



からなる群より選択される、請求項 2 記載の方法。

40. 前記コンジュゲートの前記チオカチオン性脂質部分において、

a) R^1 および R^2 は、 それぞれ独立して、

i) 飽和または一部不飽和の C_2-C_{24} のアルキル基、 および

ii) ベンジル

からなる群より選択され；

b) A^3 は、 $-O-$ であり；

c) $n = 0-8$ であり；

d) $o = 0-8$ であり；

e) $m = 1$ から 23 であり； および

f) R^3 は、 $-[(CH_2)_p-NR^4]_q-R^4$ である、請求項 39 記載の方法。

41. 前記コンジュゲートの前記チオカチオン性脂質部分において、

a) R^1 および R^2 は、 それぞれ独立して、

i) 飽和または一部不飽和の C_{18} アルキル基、

ii) 飽和または一部不飽和の C_{16} アルキル基、 および

iii) ベンジル、

からなる群より選択され、および $m = 6$ である、請求項40記載の方法。

42. 前記コンジュゲートの前記チオカチオン性脂質部分において、

- a) A^1 および A^2 は、両方とも $-O-$ であり；
- b) R^1 は、飽和 C_{16} または C_{18} のアルキル基であり、および R^2 はベンジル基であり；
- c) $n = 0$ であり；
- d) $o = 0$ であり；
- e) $q = 0$ であり；および
- f) R^4 はHである、請求項41記載の方法。

43. 前記コンジュゲートの前記チオカチオン性脂質部分において、

- a) R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、
- i) 飽和または一部不飽和の $C_2 - C_{24}$ のアルキル基、および
- ii) ベンジル

からなる群より選択され；

- b) A^3 は $-CO-O-$ であり；
- c) $n = 0 - 8$ であり；
- d) $o = 0 - 8$ であり；
- e) $m = 1$ から 23 であり；および
- g) R^3 は、 $-[(CH_2)_p - NR^4]_q - R^4$ である、請求項39記載の方法。
- o

44. 前記コンジュゲートの前記チオカチオン性脂質部分において、

- a) R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、
- i) 飽和または一部不飽和の C_{18} アルキル基、
- ii) 飽和または一部不飽和の C_{16} アルキル基、および
- iii) ベンジル、

からなる群より選択され、および $m = 5$ である、請求項43記載の方法。

45. 前記コンジュゲートの前記チオカチオン性脂質部分において、

a) A^1 および A^2 は、両方とも $-O-$ であり；

b) R^1 は、飽和 C_{16} または C_{18} のアルキル基であり、および R^2 は、ベンジル基であり；

c) $n = 0$ であり；

d) $o = 0$ であり；

e) $q = 0$ であり；および

f) R^4 は H である、請求項 4 4 記載の方法。

4 6. 前記コンジュゲートの前記チオカチオン性脂質部分において、

a) A^1 および A^2 は、両方とも $-O-$ であり；

b) R^1 および R^2 は、それぞれ、飽和 C_{16} または C_{18} のアルキル基であり；

c) $n = 0$ であり；

d) $o = 0$ であり；

e) $q = 0$ であり；および

f) R^4 は H である、請求項 4 1 記載の方法。

4 7. 前記生体分子がオリゴヌクレオチドである、請求項 3 7 記載の方法。

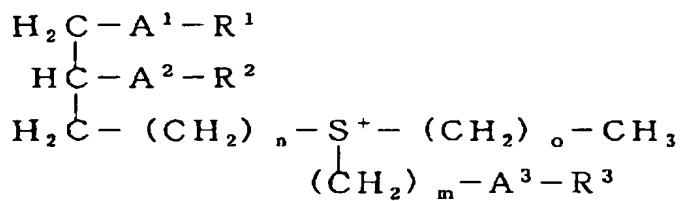
4 8. 前記オリゴヌクレオチドおよび前記チオカチオン性脂質が、共有結合により結合して前記コンジュゲートを形成する 2 つの成分を含む、請求項 4 7 記載の方法。

4 9. 前記結合が、前記成分の一方の N -ヒドロキシスクシネット基と他方の成分のアミノ基との反応により形成される、請求項 4 8 記載の方法。

5 0. リポソームを含む、少なくとも 1 つの生体分子を細胞内に導入するための組成物であって、前記リポソームはアンモニウムまたはスルホニウムイオン含有脂質、ビタミン D 誘導体、pH 感受性両親媒性物質、および生体分子を含むことを特徴とする組成物。

5 1. 前記生体分子がオリゴヌクレオチドである、請求項 5 0 記載の組成物。

5 2. 前記脂質が次の一般構造：



[式中、

A^1 および A^2 は、同一または異なり、 $-\text{O}-\text{CO}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{CO}-$ または $-\text{S}-$ であり；

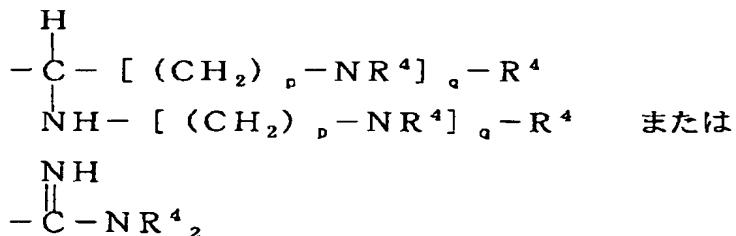
A^3 は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CO}-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CO}-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-\text{CS}-$ 、 $-\text{CS}-\text{O}-$ 、 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CS}-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CS}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-$ 、または存在せず；

R^1 および R^2 は、同一または異なり、H または C_1 から C_{23} の飽和または一部不飽和のアルキルまたはアラルキルであり、ただし、 R^1 および R^2 の少なくとも 1 つは H ではなく；

R^3 は、 C_1 から C_{12} のアルキル、アラルキル、アルカリール、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールであり；または

R^3 は、アミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドまたはペントペプチドであり；または

R^3 は、 $-[(\text{CH}_2)_p-\text{NR}^4]_q-\text{R}^4$ 、
 $- (\text{CH}_2)_p-\text{NR}^{43+}$ 、



(式中、 p は 1 から 5 であり、 q は 0 から 4 であり、および R^4 は H または C_1 から C_4 のアルキルである) であり；および

m 、 n および o は 0 から 8 であり、ただし、 $m \geq 1$ でありかつ $(m+n+o) \geq 3$ である]

およびその光学異性体および／または塩である、請求項50記載の組成物。

53. 前記リポソーム中の脂質対ビタミンD誘導体対両親媒性物質のモル比が約10:5:2である、請求項52記載の組成物。

54. 前記ビタミンD誘導体がビタミンD₃である、請求項53記載の組成物。

55. 前記両親媒性物質が、脂肪族カルボン酸およびDOP Eからなる群より選択される、請求項54記載の組成物。

56. 前記カルボン酸がオレイン酸である、請求項55記載の組成物。

57. 前記脂質において、

a) A¹およびA²は、それぞれ独立して、-O-、-O-CO-および-S-からなる群より選択され；

b) R¹およびR²は、それぞれ独立して、

i) 飽和または一部不飽和のC₂-C₂₄の炭化水素基、

ii) ベンジル、および

iii) フェネチル

からなる群より選択され；

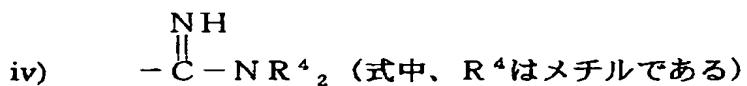
c) A³は、-O-、-CO-O-、-S-および-NH-CO-からなる群より選択されるか、または存在せず；

d) R³は、

i) 飽和または一部不飽和のC₁-C₁₂のアルキルまたはアラルキル、

ii) -[(CH₂)_p-NR⁴]_q-R⁴ (式中、pは3-4であり、qは0-4であり、およびR⁴はHである)、

iii) -(CH₂)_p-NR⁴₃₊ (式中、pは2-3であり、およびR³はメチルである)、および



からなる群より選択される、請求項52記載の組成物。

58. 前記脂質において、

a) R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、
 i) 飽和または一部不飽和の $C_2 - C_{24}$ のアルキル基、および
 ii) ベンジル
 からなる群より選択され；
 b) A^3 は、 $-O-$ であり；
 c) $n = 0 - 8$ であり；
 d) $O = 0 - 8$ であり；
 e) $m = 1$ から 23 であり；および
 f) R^3 は、 $-[(CH_2)_p - NR^4]_q - R^4$ である、請求項 5 7 記載の組成物。

5 9. 前記脂質において、
 a) R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、
 i) 飽和または一部不飽和の C_{18} アルキル基、
 ii) 飽和または一部不飽和の C_{16} アルキル基、および
 iii) ベンジル
 からなる群より選択され、および $m = 6$ である、請求項 5 8 記載の組成物。

6 0. 前記脂質において、
 a) A^1 および A^2 は、両方とも $-O-$ であり；
 b) R^1 は、飽和 C_{16} または C_{18} のアルキル基であり、および R^2 は、ベンジル基であり；
 c) $n = 0$ であり；
 d) $o = 0$ であり；
 e) $q = 0$ であり；および
 f) R^4 は H である、請求項 5 9 記載の組成物。

6 1. 前記脂質において、
 a) R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、
 i) 飽和または一部不飽和の $C_2 - C_{24}$ のアルキル基、および
 ii) ベンジル

からなる群より選択され；

- b) A^3 は、 $-CO-O-$ であり；
- c) $n = 0 - 8$ であり；
- d) $o = 0 - 8$ であり；
- e) $m = 1$ から 23 であり；および
- g) R^3 は、 $-[(CH_2)_p-NR^4]_q-R^4$ である、請求項 57 記載の組成物。

6.2. 前記脂質において、

- a) R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、
- i) 飽和または一部不飽和の C_{18} アルキル基、
- ii) 飽和または一部不飽和の C_{16} アルキル基、および
- iii) ベンジル

からなる群より選択され、および $m = 5$ である、請求項 61 記載の組成物。

6.3. 前記脂質において、

- a) A^1 および A^2 は、両方とも $-O-$ であり；
- b) R^1 は、飽和 C_{16} または C_{18} のアルキル基であり、および R^2 は、ベンジル基であり；
- c) $n = 0$ であり；
- d) $o = 0$ であり；
- e) $q = 0$ であり；および
- f) R^4 は H である、請求項 62 記載の組成物。

6.4. 前記脂質において、

- a) A^1 および A^2 は、両方とも $-O-$ であり；
- b) R^1 および R^2 は、それぞれ、飽和 C_{16} または C_{18} のアルキル基であり；
- c) $n = 0$ であり；
- d) $o = 0$ であり；
- e) $q = 0$ であり；および
- f) R^4 は H である、請求項 59 記載の組成物。

65. 少なくとも1つの生体分子を細胞内に導入する方法であって、

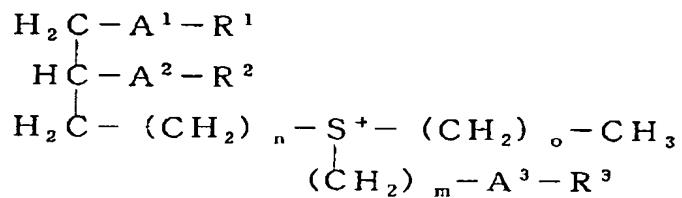
a) リポソームを含む医薬配合物を用意し、ここで、前記リポソームは、薬学的に許容される担体中に、アンモニウムまたはスルホニウムイオン含有脂質、ビタミンD誘導体、pH感受性両親媒性物質、および生体分子を含み；そして

b) 前記細胞を医薬配合物と接触させて、前記生体分子の前記細胞中への送達を容易にする、

の各工程を含む方法。

66. 前記生体分子がオリゴヌクレオチドである、請求項65記載の方法。

67. 前記脂質が次の一般構造：



[式中、

A^1 および A^2 は、同一または異なり、 $-\text{O}-\text{CO}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{CO}-$ または $-\text{S}-$ であり；

A^3 は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CO}-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CO}-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-\text{CS}-$ 、 $-\text{CS}-\text{O}-$ 、 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CS}-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CS}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-$ 、または存在せず；

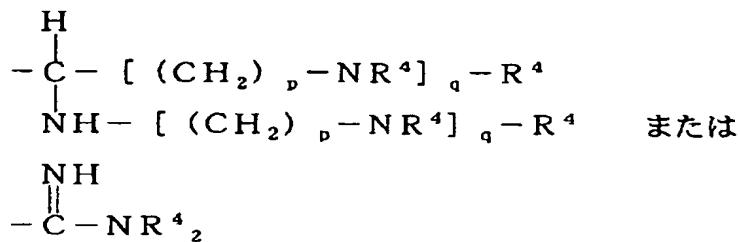
R^1 および R^2 は、同一または異なり、H、またはC₁からC₂₃の飽和または一部不飽和のアルキルまたはアラルキルであり、ただし、 R^1 および R^2 の少なくとも1つはHではなく；

R^3 は、C₁からC₁₂のアルキル、アラルキル、アルカリール、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールであり；または

R^3 は、アミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドまたはペプチドであり；または

R^3 は、 $-[(\text{CH}_2)_p-\text{NR}^4]_q-\text{R}^4$ 、

— (CH₂)_p—NR⁴₃、



(式中、pは1から5であり、qは0から4であり、およびR⁴はHまたはC₁か

らC₄のアルキルである) であり; および

m、nおよびoは0から8であり、ただし、m≥1でありかつ(m+n+o)≥3である]

およびその光学異性体および/または塩である、請求項6.5記載の方法。

6.8. 前記リポソーム中の脂質対ビタミンD誘導体対両親媒性物質のモル比が約1.0:5:2である、請求項6.7記載の方法。

6.9. 前記ビタミンD誘導体がビタミンD₃である、請求項6.8記載の方法。

7.0. 前記両親媒性物質が、脂肪族カルボン酸およびDOP Eからなる群より選択される、請求項6.9記載の方法。

7.1. 前記カルボン酸がオレイン酸である、請求項7.0記載の方法。

7.2. 前記脂質において、

a) A¹およびA²は、それぞれ独立して、—O—、—O—CO—および—S—からなる群より選択され;

b) R¹およびR²は、それぞれ独立して、

i) 飽和または一部不飽和のC₂—C₂₄の炭化水素基、

ii) ベンジル、および、

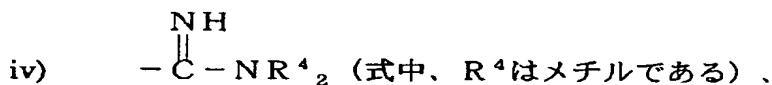
iii) フェネチル

からなる群より選択され;

c) A³は、—O—、—CO—O—、—S—および—NH—CO—からなる群より選択されるか、または存在せず;

d) R³は、

- i) 飽和または一部不飽和のC₁—C₁₂のアルキルまたはアラルキル、
- ii) — [(C H₂)_p—N R⁴]_q—R⁴ (式中、pは3—4であり、qは0—4であり、およびR⁴はHである)、
- iii) — (C H₂)_p—N R⁴₃⁺ (式中、pは2—3であり、およびR³はメチルである)、および



からなる群より選択される、請求項6 7記載の方法。

7 3. 前記脂質において、

- a) R¹およびR²は、それぞれ独立して、
- i) 飽和または一部不飽和のC₂—C₂₄のアルキル基、および
- ii) ベンジル

からなる群より選択され；

- b) A³は、—O—であり；
- c) n=0—8であり；
- d) o=0—8であり；
- e) m=1から23であり；および
- f) R³は、— [(C H₂)_p—N R⁴]_q—R⁴ である、請求項7 2記載の方法。

7 4. 前記脂質において、

- a) R¹およびR²は、それぞれ独立して、
- i) 飽和または一部不飽和のC₁₈アルキル基、
- ii) 飽和または一部不飽和のC₁₆アルキル基、および
- iii) ベンジル

からなる群より選択され、およびm=6である、請求項7 3記載の方法。

7 5. 前記脂質において、

- a) A¹およびA²は、両方とも—O—であり；
- b) R¹は、飽和C₁₆またはC₁₈のアルキル基であり、およびR²はベンジル

基であり；

- c) $n = 0$ であり；
- d) $o = 0$ であり；
- e) $q = 0$ であり；および
- f) R^4 は H である、請求項 7 4 記載の方法。

7 6. 前記脂質において、

- a) R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、
- i) 飽和または一部不飽和の $C_2 - C_{24}$ のアルキル基、および
- ii) ベンジル

からなる群より選択され；

- b) A^3 は $-CO-O-$ であり；
- c) $n = 0 - 8$ であり；
- d) $o = 0 - 8$ であり；
- e) $m = 1$ から 23 であり；および
- g) R^3 は、 $-[(CH_2)_p - NR^4]_q - R^4$ である、請求項 7 4 記載の方法。

7 7. 前記脂質において、

- a) R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、
- i) 飽和または一部不飽和の C_{18} アルキル基、
- ii) 飽和または一部不飽和の C_{16} アルキル基、および
- iii) ベンジル

からなる群より選択され、および $m = 5$ である、請求項 7 6 記載の方法。

7 8. 前記脂質において、

- a) A^1 および A^2 は、両方とも $-O-$ であり；
- b) R^1 は、飽和 C_{16} または C_{18} のアルキル基であり、および R^2 はベンジル基であり；
- c) $n = 0$ であり；
- d) $o = 0$ であり；

e) $q = 0$ であり；および

f) R^4 は H である、請求項 7 7 記載の方法。

7 9. 前記脂質において、

a) A^1 および A^2 は、両方とも $-O-$ であり；

b) R^1 および R^2 は、それぞれ、飽和 C_{16} または C_{18} のアルキル基であり；

c) $n = 0$ であり；

d) $O = 0$ であり；

e) $q = 0$ であり；および

f) R^4 は H である、請求項 7 4 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

チオカチオン性脂質、医薬組成物およびその使用方法発明の分野

本発明は合成のカチオン性親油性化合物に関する。特に、プラスに荷電したスルホニウムイオンを有するチオカチオン性脂質、生体分子結合体や複合体の成分としてのチオカチオン性脂質の使用およびそれらの医薬組成物としての使用に関する。

発明の背景

生体内(*in vivo*)治療剤のような生体分子を含む製剤は、毒性を発現せず、通常の生物学的工程によって最初に分解することなく生体系に効果を発揮することができる必要がある。時には毒性を有する化合物や不安定な化合物をより効果あるように、複合体配達(*delivery*)系または化学修飾の使用が必要となる。特に、高く荷電した、不溶性および／または高分子量の薬剤は、時には担体と結合されまたは配達媒体と混合されないと薬理学的有用性が限定される。

薬剤の効果的な投与と関連する問題は、ある種の薬剤は細胞に取り込まれなければその生物学的効果を発現できないという事実により複雑化される。例えば、遺伝子機能の調整剤としてのオリゴヌクレオチドの使用は、細胞成分と細胞内、時には核内のレベルで相互に作用する能力に負っている。しかし、オリゴヌクレオチドは他のポリアニオン性物質と同様に、水溶液中で配達されるとき、貧弱な細胞取込みしか示さない。

オリゴヌクレオチドの細胞内取込みを高めるために多くのアプローチが提案されている。そのいくつかは、ウイルスベクター(Cepko等, *Cell* 37: 1053-1062 (1984))、細胞レセプターリガンドとの共有結合(Myers等, ヨーロッパ特許第273,085号(1988); Wu等, *J. Biol. Chem.*, 263: 14621-14624(1988); Vestweber等, *Nature* 338: 170-172(1989))の使用のような生物学的アプローチを含んでいる。他に細胞へのDNAの直接的なマイクロインジェクション(Capecchi等, *Cell* 22: 479-488(1980))や細胞エレクトロポレーション(Potter等, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81: 7161-7165(1984))のような物理学的アプローチを含む方

法もある。さらには親油性部分の付加 (Shea等, *Nucleic Acid Research* 18(13) : 3777-3787(1990) ; MacKellar 等, *Nucleic Acid Research* 20(13) : 3411-3417(1992)) やポリペプチド (Stevenson 等, *J. Gen. Virol.*, 70:2673-2682(1989)) のような化学的アプローチを主に含む方法もある。

リポソームのような配送媒体をオリゴヌクレオチドの細胞内配送に使用することも開示されている。 (Felgner 等, U S P 5,264,618(1993) ; Eppstein等, U S P 4,897,355 (1993) ; およびWang 等, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84: 7851-7855(1987))。リポソーム製剤を使用する利点はこれらの物質の天然に発生した細胞膜成分に似せる能力である。これは細胞膜とエンドソーム膜の融合を促進し、結果的にリポソーム内容物を細胞質内に配送する。このような膜融合がなければ、細胞外物質はエンドサイトーシスによって取り込まれ、細胞質中に開放される前にファゴソームの中で分解するかもしれない。

生体分子の細胞内配送に最も有用なリポソームはしばしば各種の親油性置換基の混合物を含む複合製剤である。これらの複合混合物は pH感受性、温度感受性およびサイズのようなリポソームの物理的特性を最適化することを可能とする。最近のある進歩は、ジオレイルホスファチジルエタノールアミン(“D O P E ”)のようなある pH感受性の両親媒性化合物は酸性 pH下で不安定になるリポソームを処方するのに使用できることが認められたことである。これは分解性の酸性 pH およびエンドソームの酵素含量に晒されたとき、リポソームとエンドソーム膜との融合を促進し、結果的にリソソームの内容物を細胞質内に開放する (R opert等, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 183(2) : 879-895 (1992) ; および Ju liano等, *Antisense Research and Development* 2 : 165-176(1992)を参照)。リポソーム中のステロール含有もよく知られている。一般にリポソーム製剤中のステロールの存在は *in vitro*、*in vivo* 両方において安定性が高まる。コレステロールやビタミン D₃ のよう有機酸誘導体を含む生体分子の配送のためのリポソーム製剤はそれらの誘導体化されていない水不溶性の等価物よりも処方するのがより容易であることが報告されている (Janoff 等, U S P 4,721,612 および 4,891,208)。しかし、ある極性の脂質を含む複合リポソーム製剤においては、そのような水溶性酸ステロール誘導体の包含はリポソームを不安定にし、効力を減

する。

カチオン性脂質（すなわち、プラスに荷電したアンモニウムやスルホニウムイオンを含むヘッドグループを有するグリセロリピドの誘導体）は、オリゴヌクレオチドのようなマイナスに荷電した生体分子の細胞内配送のためのリポソーム製剤に特に有用である。それらの有用性は、それらのプラスに荷電したヘッドグループとマイナスに荷電した細胞表面との相互反応能力に由来するものであろう。このカチオン性脂質、N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロライド（“DOTMA”）はFelgner等によって開示されている（*Proc. Nat. Acad. Sci.* 84: 7413-7417(1987)；U.S. P 4,897,355も参照）。ここで、アンモニウム基を有するカチオン性脂質はリポソーム製剤中でポリヌクレオチドによる細胞のトランスフェクションを容易にするために用いられる。これらの製剤において、DOTMAは自発的にDNAと反応して細胞表面のマイナスに荷電した脂質と融合することができるイオン性脂質-DNA複合体を形成し、最終的に細胞によるDNAの取込みをもたらすことが示された。

そのような応用のためのいくつかの他のアンモニウムイオンを含むカチオン性脂質製剤が報告されている。これらの製剤には、DOTMA類似体、1,2-ビス（オレオイルオキシ）-3-トリメチルアンモニオ）プロパン（“DOTAP”）（Stamatatos等, *Biochemistry*, 27: 3917-3925(1988)；スペルミンの親油性誘導体（Behr等, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 86: 6982-6986(1989)）；およびセチルトリメチルアンモニウムプロマイド（Pinnaduwage等, *Biochim. Biophys. Acta*, 985: 33-37(1989)）（以下も参照、Leventis等, *Biochim. Biophys. Acta*, 1023: 124-132(1990)；Zhou等, *Biochim. Biophys. Acta*, 1065: 8-14(1991)；Farhood等, *Biochim. Biophys. Acta*, 1111: 239-246(1992)；およびGao等, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 179: 280-285(1991)）がある。いくつかの商業的に使用できるカチオン性脂質には、DOTMA（Gibco BRL, Bethesda, Maryland）、DOTAP（Boehringer Mannheim, Germany）、および1,2-ジアシル-3-トリメチルアンモニウムプロパン（“TAP”）（Avanti Polar Lipids, Birmingham, Alabama）がある。しかし、これらのアンモニウムイオン含有脂質の多くは細胞毒

性であることが報告されている。

スルホニウムイオンはアンモニウムイオンとは全く異なる物理学的特性を有している。事実、アンモニウムイオン含有化合物は、窒素原子が高い電気陰性度を有し、極性化および酸化しにくく、原子価電子が核に強く所有されているため、強塩基として分類される。この特性はアンモニウムイオンを含む脂質製剤と関連した毒性のいくつかと関係があるかもしれない。これに対して、スルホニウムイオンを含む化合物は、イオウ原子が低い電気陰性度を有し、容易に極性化および酸化し、原子価電子が核によってゆるやかに所有されているため、弱塩基として分類される。スルホニウムイオンを含む（すなわち“チオカチオン性”）脂質の示すこの荷電密度の少なさは、マイナスに荷電した細胞膜との反応性を高め、ならびに毒性を低下させることができる。

トランスフェクションを高める脂質の有用性と関連する一つの重要な特徴はそれらのヘッドグループの大きさであることも示唆されている。「相対的に小さな極性のヘッドグループ」を有するカチオン性脂質を含む製剤は最も有用であることが予測されている (Felgner等, *J. Biol. Chem.* 269(4) : 2550-2561(1994))。加えて、Morris-Natschke 等は (*J. Med. Chem.* 36 : 2018-2025(1993)) 抗腫瘍剤としてスルホニウム誘導体を含むホスホコリンエーテル脂質の使用を開示し、大きなヘッドグループの置換基の存在は効果を減少させることを報告している。スルホニウムイオンの物理化学的特性の故に、より大きなヘッドグループを有するチオカチオン性脂質は好適でありうる。特に、脂質ヘッドグループが隣接する飽和炭素原子に取り囲まれたイオウ原子からなるとき、スルホニウムイオンは隣接する炭素原子へ電荷の拡散を示し、これが細胞膜と脂質の反応を容易にし、ならびに毒性を低下させる。

前述のアンモニウムおよびスルホニウムイオンを含有する脂質が多くの治療用途において有用であることが示されているにもかかわらず、それらの複合リポソーム製剤の形での取り込みおよび使用は未だ最適化されていない。特に、カチオン性脂質含有製剤にビタミンDを取り込ませることにより効果を高めることは探求されていない。

そこで、本発明の目的はそれらのアンモニウムイオン含有相対物より薬剤とし

て低毒性のチオカチオン性脂質を提供することにある。

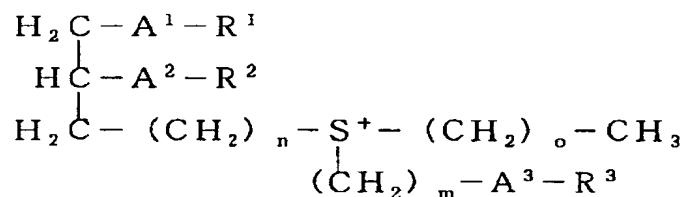
前述の親油性化合物よりも広範囲に生体分子の細胞内配送を高めるチオカチオン性脂質を含有する薬剤を提供することも本発明の目的の一つである。

顕著な効果を示すカチオン性脂質を含有するリポソーム製剤を提供することも本発明のさらなる目的である。

発明の要約

本発明は新規なスルホニウムイオン含有カチオン性脂質（“チオカチオン性脂質”）および生体分子の細胞内配送用薬剤としてのそれらの使用に関する。これらの新規化合物はスルホニウムイオンのプラスの荷電を拡散させるのに有効に働く少なくとも3個の隣接炭素原予によって囲まれたスルホニウムイオンを含むヘッドグループを有するグリセロリピドである。

特に、本発明は下記一般式のチオカチオン性脂質およびそれらの光学異性体および／または塩類に関する。



ここで、 A^1 および A^2 は同一または異なり、 $-\text{O}-\text{C}\text{O}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{C}$
 $\text{O}-$ または $-\text{S}-$ ；

A^3 は $-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{C}\text{O}-$ 、 $-\text{C}\text{O}-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{C}\text{O}-$ 、 $-\text{C}\text{O}$
 $-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-\text{C}\text{S}-$ 、 $-\text{C}\text{S}-\text{O}-$ 、 $-\text{C}\text{O}-\text{N}\text{H}-$ 、 $-\text{N}\text{H}-\text{C}\text{O}-$ 、 $-\text{C}$
 $\text{S}-\text{N}\text{H}-$ 、 $-\text{N}\text{H}-\text{C}\text{S}-$ 、 $-\text{N}\text{H}-\text{C}\text{O}-\text{O}-$ 、 $-\text{N}\text{H}-\text{C}\text{O}-\text{N}\text{H}-$ 、 $-\text{O}-\text{C}\text{O}-\text{N}\text{H}-$ または不在；

R^1 および R^2 は同一または異なり、水素原子または C_1 から C_{23} の飽和もしくは一部不飽和のアルキルもしくはアラルキル、但し R^1 および R^2 の少なくとも一方は水素原子でない；

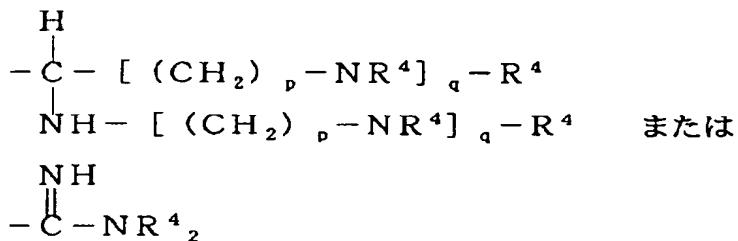
R^3 は C_1 から C_{12} のアルキル、アラルキル、アルカリール、ヘテロサイクリルもしくはヘテロアリール；または

R^3 はアミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドもしくはペプチド

ペプチド；または

R^3 は

- $[(CH_2)_p - NR^4]_q - R^4$ 、
- $(CH_2)_p - NR^4_3 +$ 、



ここで、 p は 1 ~ 5、 q は 0 ~ 4、 R^4 は水素原子もしくは C_1 ~ C_4 のアルキル；および

m 、 n および o は 0 ~ 8、但し $m \geq 1$ および $m + n + o \geq 3$

これらのカチオン性脂質は生体分子単独または他の脂質置換体と組み合わせて複合体の形で薬剤に用いることができる。またそれらは生体分子と共有結合的に結合させることができ、同様な薬剤として用いることができる。

本発明による薬剤はこれらの複合体または結合体 (conjugates) と薬学的に許容しうる担体からなる。薬学的に許容しうる担体の例は水溶液および複合体配達系を含む。好適には薬学的に許容しうる担体はリポソームである。

本発明の重要な観点は、生体分子の細胞内配達に用いるある種のカチオン性脂質含有リポソーム製剤が高い効力を示すことの発見である。このようなリポソームは一般にアンモニウムまたはスルホニウムイオンを含有する脂質、ビタミン D、pH 感受性の両親媒性化合物および生体分子からなる。

本発明の他の特徴および利点は下記詳細な説明およびクレームから明らかである。

図面の簡単な説明

図1はDOMCATOP および抗-HIVアンチセンス (antisense) オリゴヌクレオチドを含有するリポソーム製剤のウイルス抑制を示す。

図2はDODMECAP および抗-HIVアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有するリポソーム製剤のウイルス抑制を示す。

図3はコレステロールまたはビタミンD3のいずれかと抗-HIVアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有するリポソーム製剤のウイルス抑制を示す。

図4はDODMEHAPまたはDOMHYTOPのいずれかと抗-HIVアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有するリポソーム製剤の細胞の代謝活性に及ぼす影響を示す。

好適形態の詳細な説明

本発明は脂質ヘッドグループにスルホニウムイオンを有する新しい部類の合成チオカチオン性脂質を提供する。これらのチオカチオン性脂質は共有結合体 (conjugates) の構成成分および／または薬剤の成分として作用することによって生体分子の細胞内配送を高めるのに有用である。本発明の主題をさらに明らかに説明するために、ここに用いられた用語は他に示されない限り、下記のように定義される。

アルカリール：“アルカリール”は、例えばトリルまたはt-ブチルフェニルのように、少なくとも1個のアルキル置換基を有するアリール基を意味する。

アルケニル：“アルケニル”は二重結合によって互いに結合した少なくとも2個の炭素原子を有するアルキル基または部分を意味する。

アルキル：“アルキル”は直鎖または分岐鎖の炭化水素基または部分を意味する。単独で用いられるとき、アルキルの用語は飽和炭化水素基を表す。

アルキニル：“アルキニル”は三重結合によって結合した少なくとも2個の炭素原子を有するアルキル基または部分を意味する。

両親媒性の：“両親媒性の(amphiphilic)”は、有機化合物に関して用いられるとき、該化合物が疎水性(非極性)部分と親水性(極性)部分の両方からなっていることを意味する。両親媒性化合物の例にはナトリウムオレート；ホスファチジルコリン、およびジオレイルホスファチジルコリン(“DOPC”)；およびジオレイルホスファチジルエタノールアミン(“DOPE”)のようなそれらの誘導体を含む。

アンチセンスオリゴヌクレオチド：“アンチセンスオリゴヌクレオチド”は標的“センス(sense)”核酸に相補性であり、少なくとも部分的には配列特異的機構によって機能し、標的核酸の機能を調整するオリゴヌクレオチドを意味する。

アラルキル：“アラルキル”は、例えばベンジル、フェネチルまたはベンズヒドリルのように、少なくとも1個のアリール環部分が結合したアルキル基を意味する。

アリール：“アリール”は、例えばフェニルやナフチルのような、芳香族炭化水素基または部分を意味する。

生体分子：“生体分子”は望ましい生物学的活性または機能、すなわち *in vivo* で“生物学的効果”を有する有機化合物を意味する。例えば、治療剤からなる生体分子は遺伝子機能のような細胞の機能を変化させることができる。一方、MRI や CT 剤のような診断剤からなる生体分子は組織および／または器官の診断像を高める生物学的機能を有する。

相補的：“相補的”は、核酸に関して用いられるとき、ワトソン－クリック水素結合を介して他の反対の極性の核酸のヌクレオチド塩基と対合する配列を有する一極の核酸を意味する。すなわち、アデニン（“A”）はチミン（“T”）またはウラシル（“U”）と対合し、グアニン（“G”）はシトシン（“C”）と対合する。例えば、5' から 3' 方向に配列 G C A U を有する核酸は 3' から 5' 方向に配列 C G T A を有する核酸と“相補的”である。ここで相補的の用語の使用は実質的に相補的である核酸を含むように意図される。相補的核酸は、一方をプラス（“（+）”）または“センス”鎖および他方をマイナス（“（-）”）または“アンチセンス”鎖として表すこともできる。

複合体：“複合体(complex)”は二以上の化合物の非共有の物理的、通常イオン性の会合を意味する。複合体の例は、例えば、カチオン性脂質とイオン的に会合したマイナスに荷電したオリゴヌクレオチドを含む。

DODMECAP：“DODMECAP”は 1, 2-ジヘキサデシルオキシ-3-（N-（5-ヒドロキシペンチル）-N, N-ジメチルアンモニオ）プロパンおよびそれらの異性体および／または塩を意味する。

DODMEHAP：“DODMEHAP”は 1, 2-ジヘキサデシルオキシ-3-（N-（6-ヒドロキシヘキシル）-N, N-ジメチルアンモニオ）プロパンおよびそれらの異性体および／または塩を意味する。

DOMCATOP：“DOMCATOP”は S-（（2, 3-ジヘキサデシル

オキシ) プロピル) -S- (5-カルボキシペンチル) メチルスルホニウムおよびそれらの異性体および／または塩を意味する。

DOMHYTOP：“DOMHYTOP”はS-((2, 3-ジヘキサデシルオキシ) プロピル) -S- (6-ヒドロキシヘキシル) メチルスルホニウムおよびそれらの異性体および／または塩を意味する。

DOPC：“DOPC”はジオレイルホスファチジルコリンを意味する。

DOPC：“DOPC”はジオレイルホスファチジルエタノールアミンを意味する。

グリセロリピド：“グリセロリピド”はグリセリン骨格を有する親油性の分子を意味し、少なくとも1個の疎水性尾部を有し、親水性の極性のヘッドグループを有していてもよい。

ヘッドグループ：“ヘッドグループ”はグリセリン骨格に末端の炭素原子の1つで結合するグリセロリピドの部分を意味する。ヘッドグループは中性でも極性でもよい。

ヘテロアリール：“ヘテロアリール”は、例えばピロロまたはピリジルのような芳香環の一部として少なくとも1個のヘテロ原子を有する芳香族基を意味する。

ヘテロサイクリル：例えば、ピペリジニル、ピロリジニルまたはモルホリノのような、環構造の部分として少なくとも1個のヘテロ原子を有する環状基。

ハイブリダイズ：“ハイブリダイズ”は塩基対の相互反応を介して相補的核酸間でデュープレックスを形成することを意味する。

リポソーム：“リポソーム”は球状の二重層に配列された両親媒性の脂質からなる小胞を意味する。

修飾された：“修飾された (modified)”は核酸に関して用いられるとき、天然構造の任意のものが変化を受けた核酸を意味する。これらはホスホジエステル結合、糖 (RNAの場合のリボースまたはDNAの場合のデオキシリボース) および／またはプリンまたはピリミジン塩基に対する修飾を含む。修飾されたホスホジエステル結合はホスホチオエート、ホスホトリエステル、メチルホスホネートおよびホスホジチオエートを含む。

核酸配列：“核酸配列”または“配列”はヌクレオチドの特定の配列を有する

核酸、および特定の核酸に存在するヌクレオチドの配列または順序の両方を意味する。この用語が用いられている文脈からこれらの2つの意味のいずれが適用されるかは明らかであろう。

O B E H Y T O P：“O B E H Y T O P”はS-((2-ベンジルオキシ-3-オクタデシルオキシ)プロピル)-S-(6-ヒドロキシヘキシル)メチルスルホニウムおよびそれらの異性体および/または塩を意味する。

O B E C A T O P：“O B E C A T O P”はS-((2-ベンジルオキシ-3-オクタデシルオキシ)プロピル)-S-(5-カルボキシペンチル)メチルスルホニウムを意味する。

O A：“O A”はオレイン酸を意味する。

オリゴヌクレオチド：“オリゴヌクレオチド”は核酸の短いセグメントを意味する。

薬理学的に適合性の担体：“薬理学的に適合性の担体”は、生体分子をそれに添加して、毒性または薬理学的に逆効果を受容できないレベルで示すことなく、患者にその投与を容易にすることのできる配合物を意味する。

ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド：“ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド”は天然に生じたホスホジエステル結合の代わりに全ホスホロチオエート結合を有するオリゴヌクレオチドを意味する。

ポリアニオン：“ポリアニオン”は2以上のマイナス荷電を有する分子を意味する。

配列：“配列”は核酸中のヌクレオチド塩基(A, G, C, TまたはU)のパターンまたは順序を意味する。

治療的有効量：“治療的有効量”は所望の治療上の効果を得るに十分な生物学的効果を示すに十分な量を意味する。

本発明のチオカチオン性脂質の有用性は、脂質ヘッドグループに十分に分布されたプラス電荷の存在によって高められ、これがマイナスに荷電した細胞膜と効果的に相互作用することを可能とする。これらのチオカチオン性脂質の好適な用

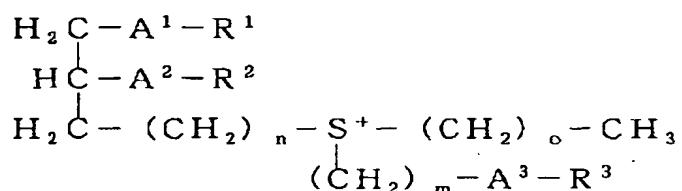
途はマイナスに荷電した生体分子の細胞内配送である。チオカチオン性脂質は、また生体分子のマイナス電荷をバランスして、生ずる製剤を中性にするように機能する。

能する。特に好適な用途は、例えばホスホロチオエートオリゴヌクレオチドのようなオリゴヌクレオチドの細胞内配送である。それらはヨードを含有するCT剤のようある種の診断イメージング剤の細胞内配送においても有用である。

本発明のチオカチオン性脂質は天然発生の細胞膜成分を真似るよう設計される。このことにより、チオカチオン性脂質および関連生体分子が細胞膜と融合し、それが細胞内配送を促進することが可能となる。細胞膜と十分に融合することができないと(時には物質の“融合(fusogenic)”特性として表される)、外来物は食食されリソソームの酵素によって速やかに分解される。

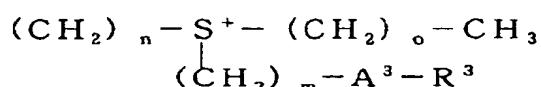
I. チオカチオン性グリセロリピドの構造

本発明の新規なチオカチオン性脂質は構造式Iの一般式で表すことができるものおよびそれらの光学異性体および/または塩である。



構造式I

構造式Iによって与えられるチオカチオン性脂質は3つの部分;骨格、1以上の尾部およびヘッドグループを有するものとして説明できる。上に示すように骨格は3つの炭素のグリセリン部分からなり;尾部はR¹およびR²によって与えられ、A¹およびA²を介して骨格に結合しており;ヘッドグループは



[で与えられる。

本発明のカチオン性グリセロリピドは、プラスに荷電したスルホニウムイオンS⁺を含んでいる。スルホニウムイオンはプラスに荷電したアンモニウムイオンに比較して低い電荷密度を提供する利点を有する。ヘッドグループの周囲の炭素

と結合してプラス電荷は拡散され、マイナスに荷電した細胞表面と相互反応が高められ、ならびに効率が改良される。ここで m 、 n および o はそれぞれ0～8である。

ある。ただし、 $m \geq 1$ 、 $m + n + o \geq 3$ である。

A^1 および A^2 はグリセリン骨格と親油性尾部間の結合を提供する。 A^1 および A^2 は同一または異なり、 $-O-CO-$ 、 $-O-$ 、 $-S-CO-$ または $-S-$ であることができる。特に好適な形態は、 A^1 および A^2 の双方が $-O-$ で、 R^1 および R^2 が $-CH_2-$ 部分を介して A^1 および A^2 と結合している長鎖（C16～C18）アルキル部分である構成である。これらの長鎖アルキルエーテル脂質はエステルベースの脂質よりも代謝的により安定であり、細胞中に核酸を運搬するのに優れていることが発見された。このタイプの特に好適な化合物は、DOMHTOP、またはそのカルボン酸誘導体、DOMCATOPである。実施例1パートAおよびBをそれぞれ参照のこと。

本発明の他の面は好適なリポソーム構造の形成を選択的に行うために R^2 部分の炭化水素鎖の長さを変化させる能力である。例えば、 A^2 が $-O-$ で R^2 がHのとき、形成されるグリセロリピド（すなわち“リソリピド”）は単一の尾部をもつ。より長鎖の R^2 部分を有する脂質と組み合わせたリソリピドの使用は1個以上の二重層を有するリポソームの形成に好適である。リソリピド単独の使用はミセルの形成に好適である。このような混合脂質製剤は成分の割合を変化させることによりサイズおよび細胞の取込みを最適化することができる。

本発明による他の好適な部類のチオカチオン性脂質は、 A^2 が $-O-$ で、 R^2 がアラルキル $CH_2C_6H_5$ である。これらのベンジル誘導体は芳香族部分の存在により疎水性が高められ、したがって好適な製剤特性を示すことができる。このように変化したものの中で特に好適な化合物はOBETHTOP、または等価のカルボン酸誘導体、OBECATOPである。それぞれ実施例1パートCおよびD参照。

融合特性および製剤特性を最適化するために種々の程度の不飽和度を有する R^1 および R^2 部分を取り込ませることも可能である。

本発明によって提供される他の新規なチオカチオン性脂質は R^3 の位置の分子

に取り込まれた追加のカチオン基を有する分子である。このタイプのカチオン性脂質の好適な形態においては、付加的なカチオン性部分は、例えばリシン、アルギニン、ヒスチジンまたはトリプトファンのようなアミノ酸の付加により誘導

される。

R^3 は $-O-$ 、 $-O-CO-$ 、 $-CO-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-CO-$ 、 $-CO$
 $-S-$ 、 $-O-CS-$ 、 $-CS-O-$ 、 $-CO-NH-$ 、 $-NH-CO-$ 、 $-C$
 $S-NH-$ 、 $-NH-CS-$ 、 $-NH-CO-O-$ 、 $-NH-CO-NH-$ 、 $-$
 $O-CO-NH-$ 、または不在であり得る A^3 を介してチオカチオン性脂質と結合している。リンカーの選択または必要性は当業者によって容易に決定される。

本発明のチオカチオン性脂質は公知の方法を用いて容易に合成することができる。典型的には、グリセリンから誘導されるようなリピドアルコールを四臭化炭素とトリフェニルホスフィンの混合物のようなプロム化剤を用いてプロム誘導体に変換する。このようにして形成されたプロム誘導体をナトリウムチオメトキシドのようなアルキルメルカプタンのナトリウム塩と反応させてアルキルチオグリセリン中間体を得る。この中間体を、必要に応じ適当な溶媒を用いてハロアルキル化合物の存在下に還流してアルキル化して、カチオン性脂質をそのハロゲン塩として得る。

チオカチオン性脂質-生体分子結合体 (conjugates)

本発明のチオカチオン性脂質は生体分子と共有結合的に結合したチオカチオン性脂質からなる組成物の形であってもよい。

生体分子は所望の生物学的効果を示し、この生物学的効果をカチオン性脂質と結合した後も保持しているかぎり如何なる有機化合物でもよい。生体分子の例としては、限定されるものではないが、蛋白質、ホルモン、遺伝子、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオシド、薬物(drugs)、抗生物質、抗体、診断イメージング剤、およびそれらの誘導体および類似体を含む。チオカチオン性脂質と生体分子の間の共有結合は公知の方法を用いてなし遂げることができる。例えば、PCT WO 94/05624 参照。

生体分子は好ましくはオリゴヌクレオチドであり、さらに好ましくはヌクレア

一ゼによる分解に対する抵抗の目的でホスホロチオエートオリゴヌクレオチドである。加えて、オリゴヌクレオチドはRNAでもDNAでもよいが、RNアーゼ(RNases)に対する抵抗性のためDNAがより好ましい。薬剤処方に有用なオリゴヌクレオチドは、典型的には、目的とするかまたは目的とするヌクレオチド配列とハイブリダイズするのに十分相補的であるかのいずれかのヌクレオチド配列を有している。該オリゴヌクレオチドは典型的にレセプターホスト細胞において生化学的機能を発揮することができ、および/または細胞組織の運行を変化させることができる。このような作用の例はトランスフェクションまたはアンチセンス剤のようなものである。

オリゴヌクレオチドの適当な長さはそのオリゴヌクレオチドが設計された特有の用途によるが、ある一般化は可能である。オリゴヌクレオチドがアンチセンス治療剤として用いられる場合、好ましくは約12と50の間であり、さらに好ましくは約15と30ヌクレオチドの間の長さである。

本発明で用いることのできるオリゴヌクレオチドは、限定されるものではないが、天然に生じた核酸、およびホスホロチオエート、メチルホスホネートまたはホスホロジチオエートヌクレオチド間結合を有するような修飾された核酸を含む。さらに、生体分子は、アデノシン、グアノシン、シチジン、チミジンおよびウリジンまたは、5-フルオロウリジン、5-アルキルウリジン、デアザグアノシン、アザグアノシン、アザチミジンのようなそれらの類似体のような天然に生じたヌクレオシドであることができる。本発明のチオカチオン性脂質に対するホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの結合部位は5'または3'末端のいずれか、ヌクレオチド間結合、ヌクレオシド塩基または骨格の糖部分を介することができる。そのような結合は如何なる公知の方法を用いてもよい。例えば、Goodechil等, *Bioconjugate Chemistry* 1(3) : 165-187 (1990)。カチオン性脂質はA³および/またはR³を介して3' -OHまたは5' -OHに結合することができる。または、カチオン性脂質はA³および/またはR³を介して、ヌクレオチド間のホスホロチオエート結合におけるOまたはS原子を介して如何なるヌクレオチド間結合で結合することができる。さらに、カチオン性脂質はA³および/また

はR³を介して、環内のCまたはN、または環外のNまたはOで塩基と結合することができる。A³および/またはR³を介して、糖部分の1'、2'または4'位に結合することもできる。

II. カチオン性脂質薬剤

本明細書で説明されるチオカチオン性脂質を用いる薬剤はチオカチオン性脂質

一生体分子結合体 (conjugates) からなるか、またはカチオン性脂質と生体分子を、脂質と生体分子間のイオン性および/または疎水性の相互反応を介して安定な会合が形成されるような条件下で互いに混合することによって形成されるカチオン性脂質一生体分子複合体 (complexes) からなることができる。いずれの場合においても、カチオン性脂質一生体分子結合体/複合体は薬学的に許容できる担体中で調製され投与される。薬学的に許容できる担体の例としては、水、食塩水、緩衝液または炭水化物溶液のような水溶液、およびリポソーム、ミクロスフェア、またはエマルジョンのような複合体配送系を含む。

III. リポソーム薬剤

本発明のチオカチオン性脂質含有生体分子薬剤は、好適にはリポソームからなる。前述のいずれの生体分子もリポソームの中にカプセル化することができる。さらに、多くの生体分子含有リポソーム薬剤が文献に記述され、本明細書のリポソーム薬剤を用いるカプセル化に適當なその他追加の生体分子の例として役立つ。

脂質集合体はカプセル化された水性の塊 (aqueous volume) を含む脂質二重層を形成した完全に閉じた構造の形態 (すなわち、単ラメラリポソーム) をとることができ、または水性の塊によって分離された1より多い同心の脂質二重層 (すなわち、多層ラメラリポソーム) を含むことができる。各脂質二重層は2つの脂質の単層からなり、その各々は疎水性の (非極性) “尾” 領域と親水性の (極性) “ヘッド” 領域を有する。二重層においては、脂質単層の疎水性の “尾” は二重層の内側に向き、一方親水性の “ヘッド” は二重層の外側に向く。生体分子がリポソームに捕らえられるのは、生体分子が脂質一生体分子結合体の形でなければ、水相の内部である。脂質一生体分子の形の場合は生体分子は二重層の内部に

埋め込まれることができる。

リポソームは当業界で知られた種々の方法で作ることができる。（例えば、Bingham 等、*J. Mol. Biol.*, 13: 238-252(1965)。これらの方法は一般に、まず脂質を有機溶媒中で攪拌して溶解させ、続いて蒸発させることを含む。次に、適当量の水相を脂質相と混合し、リポソームが形成されるに十分な時間インキュベートさせる。該水相は一般に緩衝液または糖のような他の溶質とともに懸濁された生体分子からなる。

カプセル化される生体分子に加えて、本発明のリポソームは本明細書記載のチオカチオン性脂質のみ、本明細書記載のチオカチオン性脂質の混合物、またはアニオン性脂質（例えば、ホスファチジルグリセロール、ホスファチシッド酸(*phosphaticid acid*)、または類似のアニオン性リン脂質類似体）のような他の公知の脂質と結合した本発明のチオカチオン性脂質、または天然の脂質（例えば、ホスファチジルコリンまたはホスファチジルエタノールアミン）を含む。本発明のリポソーム製剤はさらに、リソホスファチジルコリン、リソホスファチジルエタノールアミン、またはカチオン性脂質類のリソ形のようなリソ脂質を含むことができる。

リポソームは、またステロール、糖脂質、抗体や蛋白質のような組織または器官標的物質、脂肪酸、または他の天然または合成の親油性若しくは両親媒性の化合物の任意の置換基を含んでいてもよい。

リポソームに含有させるのに適當なステロールは、限定されるものではないが、コレステロールおよびビタミンDであり、これらはリポソーム製剤に安定剤として含有される。

チオカチオン性脂質の全脂質に対するモル割合は、全体としてプラス電荷のリポソーム製剤が形成されるのに十分である必要がある。この量は、カプセル化された生体分子の電荷と量、ならびにリポソームの他の成分の電荷と量による。一般的にリポソームはカチオン脂質と全脂質のモル比が約9:1から1:9であり、好ましくは約1:2から2:1である。全脂質の生体分子に対するモル比は約200:1-100:1であり、好ましくは約160:1である。

IV. 高い効果のリポソーム製剤

本発明の一つの重要な面は、カチオン性脂質—生体分子リポソーム製剤の効果はビタミンDおよび少なくとも一つのpH感受性の両親媒性脂質の存在によって高められることの発見である。アンモニウムイオンおよびスルホニウムイオン含有カチオン性脂質の双方とも生体分子の細胞内配送のためのリポソーム薬剤で有用である。

カチオン性脂質は本明細書に記載されたいずれかのチオカチオン性脂質または他の公知のアンモニウムまたはスルホニウムイオン含有カチオン性脂質であるこ

とができる。上述のように、カチオン性脂質は単独でも、他のカチオン性、中性またはアニオン性脂質と組み合わせても使用することができる。

ビタミンDはビタミンD₃（“コレカルシフェロール”とも称される）、またはビタミンDの全体としての効果を高める効果を有意に減少させることのないビタミンD類似体または誘導体であることができ、これらを本明細書において集合的に“ビタミンD”として参照する。好適には、誘導されていないビタミンD₃が用いられる。

いくつかの両親媒体(*amphiphiles*)はpHの作用でそれらの荷電を変化させる作用を有し、それ故、“pH感受性”である。例えば、オレイン酸および/またはDOP EのようなpH感受性の両親媒体を含有するリポソーム小胞はpHの作用でその電荷を変化させることができる。一方、DOP Cを含有する小胞はpH依存的にそれらの電荷を変化させることはない。両親媒体がpHの作用としてその電荷を変化する能力はリポソームの他の構成成分による。特に、アルキル鎖の飽和の程度は効果を有する。さらに、DOP Eのマイナスに荷電したホスフェイトのような両親媒体のマイナス電荷と、カチオン性脂質のプラスに荷電したヘッドグループとの間のイオン対の相互作用がある。これはpHの作用として電荷を変化させやすいDOP Eにプラスに荷電したアミノ基を残す。(Felgner等, J. Bio. Chem. 269: 1-12 (1994) 参照)。

両親媒体のpH感受性は細胞内におけるリポソーム小胞のエンドソーム膜との融合性(*fusogenicity*)を高めるのに役立つ(Ropert等, Biochem. Biophys. Res.

Commun. 183(2) : 879-85(1992)。適当なpH感受性の両親媒性脂質はDOPCおよびオレイン酸を含むが、これに限定されない。好適には、pH感受性両親媒体はオレイン酸であるが、リポソームに組み入れられた後に生理的pH(約6から7.5)またはその近くで、pHの作用として荷電を変化しやすい如何なる親油性の両親媒体も使用するのに適している。

オリゴヌクレオチドの細胞内配送のための特に好適なリポソーム製剤は、モル比が10:5:2のカチオン性脂質:オレイン酸:ビタミンD₃からなる。異なる成分および/または生体分子からなるリポソーム製剤の効果を最大限に発揮させるために他のモル比を設計することができる。そのようなモル比は公知の手法

により容易に決定することができる。例えば、*Liposome Technologies, CRC Press*, 発行者 *Gregory Gregoriadis, ed.* (1984) 参照。

V. 薬剤の配送

本発明のチオカチオン性脂質は、所望の治療効果を得るために種々の経路によりおよび動物体の種々の部位に生体分子を配送するために薬剤において用いることができる。これらの薬剤は、前述の薬学的に許容できる担体中のチオカチオン性脂質一生体分子複合体および/またはチオカチオン性脂質一生体分子結合体からなることができる。

薬剤の局所または全身配送は、体腔への薬剤の挿入、エアーゾルの吸入または通気、または筋肉内、静脈内、皮内、腹膜、皮下および局所投与からなる非経口導入を含む投与により行うことができる。

経口的に投与される薬剤は固体、液体、エマルジョン、懸濁液、またはゲルの形態であることができ、好ましくは、例えば錠剤またはカプセルのような投与量単位の形態である。錠剤は、タルク、植物油、ポリオール、ガム、ゼラチン、澱粉および他の担体のような慣習的に用いられている他の成分と組み合わせて製剤化することができる。

皮下、筋肉内または静脈内の注射を意図される非経口剤は、液体、または注射に先立ち液体中に懸濁されるための固体またはエマルジョンのいずれかとして調製することができる。そのような製剤は無菌であり、静脈内に注入される液体は

等張であるべきである。適当な賦形剤は、例えば水、デキストローズ、食塩水、グリセリンなどがある。

該製剤はエーゾルの形で鼻、喉、気管支のような体腔に投与されることもできる。

これらの製剤におけるカチオン性脂質および他の混合剤に対する生体分子の割合は投与型および要求量により変わる。

本発明の製剤の効果的な投与量は、生体分子およびその所望の生物学的活性、ならびに特定の製剤動力学、組成、物理的特性、所望の治療効果、被験者の重量による。最も効果的な投与量は公知の方法で容易に決定することができる。

VI. 治療用途

上述の生体分子製剤の好適な治療用途はアンチセンスオリゴヌクレオチドをカプセル化したリポソームを含む治療剤の細胞内配送分野である。HIV抑制に有用な特に好適な治療薬剤は、SEQ. ID. NO. 1で与えられるホスホチオエートオリゴヌクレオチドの配送媒体としてのチオカチオン性脂質含有リポソームからなる。このオリゴヌクレオチドはHIV REVタンパク質をコードするSEQ. ID. NO. 2で与えられるmRNA配列と相補的である。(Petersen等、公開PCT出願番号 WO95/03407参照)。

実験工程

本発明は好適な形態の代表である以下の実施例を通してよりよく理解されるが、発明の範囲を限定するように解釈されるべきではない。本明細書で用いられた全ての化合物は、特にことわらないかぎり、ミルウォーキー、WIのアルドリッヂケミカル社から購入した。

実施例 1

カチオン性脂質の合成

パートA : Domh y topのプロマイド塩の形の合成

ステップ1. 1, 2-O-ジヘキサデシル-3-プロモ-1, 2-プロパンジオールの合成

磁石の攪拌棒を備えた250mlの丸底フラスコ中で、120mlのトルエン

に 1. 92 g (3. 6 mmol) のジヘキサデシルグリセリン (シグマケミカル社) を溶解させた。この溶液に 3. 54 g (10. 7 mmol) の四臭化炭素および 2. 80 g (10. 7 mmol) のトリフェニルホスフィンを添加し、反応混合液を室温で一夜 (18 時間)攪拌した。黄色の懸濁液を濾過し、濾液をロータリーエバボレイターで濃縮して白色固体を得た。この残渣をトルエンに溶解させ、飽和の塩化ナトリウムで一回洗浄し、無水硫酸マグネシウム上で乾燥させ、ロータリーエバボレイターで真空下に濃縮して 2. 5 g の白色粉末として粗生成物を得た。この粗生成物をシリカゲル 60 (E. メルク社, ドイツ) 上でフラッシュカラムクロマトグラフィーにより、100 ml のヘキサン、ヘキサン中 1 % 酢酸エチル、ヘキサン中 2 % 酢酸エチル最終はヘキサン中 3 % 酢酸エチルで連続溶出させて精

製した。各分画 (8 ml) を集め、薄層クロマトグラフィー ("TLC") でスクリーンし、純生成物 (シリカゲル、ヘキサン中 5 % 酢酸エチル、 $R_f = 0.59$) を含む分画をプールした。プールされた分画をロータリーエバボレイターで真空下に濃縮して量論的收量の 1, 2-ジヘキサデシル-3-ブロモ-1, 2-ブロパンジオールを白色粉末として得た。

ステップ 2. 1, 2-0-ジヘキサデシル-3-メチルチオ-1, 2-ブロパンジオールの合成

磁石の攪拌棒を備えた 250 ml の丸底フラスコ中で、乾燥テトラヒドロフラン 100 ml に、ラセミ体の 1, 2-0-ジヘキサデシル-3-ブロモ-1, 2-ブロパンジオール (ステップ 1 より) 2.0 g (3. 3 mmol) を溶解させた。この溶液に 2. 33 g (33. 2 mmol) のナトリウムチオメトキシド粉末を加え反応混合物を室温で一夜攪拌した。反応を TLC (シリカゲル、ヘキサン中 5 % 酢酸エチル) でモニターし、反応液に 490 mg (7 mmol) のナトリウムチオメトキシドを追加した。3 時間後、混合物を濾過し、濾液を 50 ml のテトラヒドロフランで洗浄した。化合した濾液をロータリーエバボレイターで真空下に濃縮して黄色の残渣を得た。この残渣を 50 ml のクロロホルムに溶解させ、有機溶液を重炭酸ナトリウム濃縮液 25 ml で 2 回洗浄した。有機相を無水硫酸マグネシウム上で乾燥させ、ロータリーエバボレイターで真空下に濃縮して淡い黄色の

油性残渣として粗生成物を得た。粗生成物はシリカゲル60 (E. メルク社、ドイツ) 上、ヘキサン中酢酸エチル0から10%の段階的勾配 (step gradiennt) を用いるカラムクロマトグラフィーを用いて、精製した。各分画を集め、TLCでスクリーンした。純生成物を含む分画をプールし、濃縮して1, 2-0-ジヘキサデシル-3-メチルチオ-1, 2-プロパンジオールを収率90%で得た。

ステップ3. 1, 2-0-ジヘキサデシル-3-(S-メチル)- (6-ヒドロキシヘキシル) -スルホニウムプロマイドの合成

磁石の攪拌棒と還流冷却器を備えた250mlの丸底フラスコ中で、トルエン120mlに、ラセミ体の1, 2-0-ジヘキサデシル-3-メチルチオ-1, 2-プロパンジオール (ステップ2より) 1.0g (1.75mmol) を溶解させた。この溶液に3.17g (17.5mmol) の6-ブロモヘキサンノールを加え、

この溶液を135°Cで3日間加熱した。茶色い溶液を室温に冷却し、ロータリー エバポレイターで濃縮し、茶色い油性の残渣を得た。この残渣を50mlのクロロホルムに溶解し、30mlの飽和食塩水で2回洗浄した。クロロホルム層を硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過による硫酸マグネシウムの除去に続き、シリカ床を通して液中の極度に極性の不純物を完全に除去した。次にこの溶液を真空下に濃縮してワックス状の残渣として粗生成物を得た。粗生成物は、シリカゲル60 (E. メルク社、ドイツ) を用いるカラムクロマトグラフィーを用いて、最初に100mlヘキサン、続いて100mlのヘキサン中10%酢酸エチル、最後的にヘキサン中30%酢酸エチルで連続的に溶出させた。TLCにより決定されたような生成物を含む分画をプールし、濃縮し、低融点の黄色固体として収率88%でDOMHYTOPの塩を得た。

パートB: Domcatopのプロマイド塩の合成

磁石の攪拌棒と還流冷却器を備えた250の丸底フラスコ中で、トルエン120mlに、ラセミ体の1, 2-0-ジヘキサデシル-3-メチルチオ-1, 2-プロパンジオール (パートA、ステップ1および2のように調製) 1.0g (1.75mmol) を溶解させた。この溶液に3.41g (17.5mmol) の6-ブロモヘキサン酸(6-buromohexanoic acid)を添加し、溶液を4日間135°Cで加熱

した。茶色の溶液を室温まで冷却し、ロータリーエバポレイターで濃縮し、茶色い油性の残渣を得た。この残渣を 50 ml のクロロホルムに溶解し、シリカ床を通して溶液中の極度に極性の不純物を除去した。得られた溶液は次に 30 ml の飽和食塩水で洗浄した。次にクロロホルム層を無水硫酸マグネシウム上で乾燥させた。濾過による硫酸マグネシウムの除去に続き、真空下に濃縮して、黄色油性残渣として粗生成物を得た。この粗生成物をシリカゲル (E. メルク社、ドイツ) カラムを用いるカラムクロマトグラフィーにより、100 ml のヘキサン、次に 10 ml のヘキサン中 10% 酢酸エチル、最後にヘキサン中 30% 酢酸エチルで連続的に溶出させて精製した。ヘキサン中 30% 酢酸エチルからの分画は TLC で決定されたような生成物を含んでおり、この分画をプールし、濃縮して低融点の黄色固体として DOMCATOP のプロマイド塩を収率 42% で得た。

パート C : O b e h y t o p のプロマイド塩の合成

ステップ 1. 1-O-オクタデシル-2-O-ベンジル-3-ブロモ-1,2-プロパンジオールの合成

磁石の攪拌棒を備えた 250 ml の丸底フラスコ中で 2.00 g (4.6 mmol) の 1-O-オクタデシル-2-O-ベンジルグリセリン (ベイケム社、スイス) を 120 ml のトルエンに溶解させた。この溶液に 4.58 g (13.8 mmol) の四臭化炭素と 3.62 g (13.8 mmol) のトリフェニルfosfin を加え、反応混合物を室温で 4 時間攪拌した。黄色の懸濁液を濾過し、濾液をロータリーエバポレイターで濃縮して白色固体を得た。この残渣を 50 ml のクロロホルムに溶解させ、30 ml の飽和重炭酸ナトリウムで 2 回洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、ロータリーエバポレイターで真空下に濃縮して白色固体として 2.5 g の粗生成物を得た。この粗生成物をシリカゲル 60 (E. メルク社、ドイツ) カラムを用いるフラッシュカラムクロマトグラフィーにより、100 ml のヘキサン、ヘキサン中 1% 酢酸エチル、ヘキサン中 2% 酢酸エチル、最後にヘキサン中 3% 酢酸エチルで連続溶出させることによって精製した。集められた分画を TLC でスクリーンし、純生成物 (シリカゲル、ヘキサン中 5% 酢酸エチル、 $R_f = 0.56$) を含む分画をプールした。プールされた分画をロータリ

—エバボレーターで真空下に濃縮して白色粉末として1-O-オクタデシル-2-O-ベンジル-3-ブロモ-1, 2-プロパンジオールを量論的収量で得た。

ステップ2. 1-O-オクタデシル-2-O-ベンジル-3-メチルチオ-1, 2-プロパンジオールの合成

磁石の攪拌棒を備えた250mlの丸底フラスコ中で、ラセミ体の1-O-オクタデシル-2-O-ベンジル-3-ブロモ-1, 2-プロパンジオール1.9g (4.0mmol) を100mlの乾燥テトラヒドロフランに溶解させた。この溶液に2.8g (40.0mmol) のナトリウムチオメトキシド粉末を添加し、反応混合物を室温で4.5時間攪拌した。反応をTLC (シリカゲル、ヘキサン中5%酢酸エチル; R_f = 0.51) でモニターした。混合物を濾過し、濾液を50mlのテトラヒドロフランで洗浄した。化合した濾液をロータリーエバボレーターで真空下に濃縮して黄色粉末を得た。この残渣を50mlのクロロホルムに溶解させ、30mlの重炭酸ナトリウム濃縮溶液で2回洗浄した。有機相を無水

硫酸マグネシウムで乾燥させ、ロータリーエバボレーターで真空下に濃縮して淡い黄色の油性残渣として粗生成物を得た。この粗生成物をシリカゲル60 (E. メルク社、ドイツ) 上、ヘキサン中酢酸エチル0から10%の段階的勾配 (step gradiennt) を用いるカラムクロマトグラフィーを用いて、精製した。集められた分画はTLCでスクリーンした。純生成物を含む分画を (シリカゲル、ヘキサン中5%酢酸エチル R_f = 0.51) プールし、濃縮して、1-O-オクタデシル-2-O-ベンジル-3-メチルチオ-1, 2-プロパンジオールを収率90%で得た。

ステップ3. 1-O-オクタデシル-2-O-ベンジル-3-(S-メチル-S-(6-ヒドロキシヘキシル))-スルホニウムプロマイドの合成

磁石の攪拌棒と還流冷却器を備えた250mlの丸底フラスコ中で、ラセミ体の1-O-オクタデシル-2-O-ベンジル-3-メチルチオ-1, 2-プロパンジオール1.02g (2.2mmol) を120mlのトルエンに溶解させた。この溶液に3.98g (22.0mmol) の6-ブロモヘキサノールを添加し、溶液を3日間135°Cに加熱した。次に茶色の溶液を室温に冷却し、ロータリーエバ

ポレイターで濃縮して茶色の油性残渣を得た。この残渣を 50 ml のクロロホルムに溶解させ、シリカ床を通して極端に極性の不純物を除去した。生じた溶液を、次に、飽和の重炭酸ナトリウム 30 ml で 2 回洗浄し、飽和の塩化ナトリウム溶液 30 ml で抽出した。クロロホルム層を無水硫酸マグネシウム上で乾燥させた。濾過により硫酸マグネシウムを除去後、溶液を真空下に濃縮して黄色の油性残渣として粗生成物を得た。この粗生成物をシリカゲル 60 (E. メルク社、ドイツ) を用いるカラムクロマトグラフィーにより、100 ml のヘキサン、次に 10 ml のヘキサン中 10 % 酢酸エチル、最後にヘキサン中 30 % 酢酸エチルで連続的に溶出させて精製した。TLC (シリカゲル、ヘキサン中 30 % 酢酸エチル、 $R_f = 0.41$) で決定されたような生成物を含む分画をプールし、濃縮して、低融点の黄色固体として収率 85 % で OBEHYTOP のプロマイド塩を得た。

パート D : 実施例 4 : O b e c a t o p のプロマイド塩の合成

磁石の攪拌棒と還流冷却器を備えた 250 ml の丸底フラスコ中で、ラセミ体の 1-O-オクタデシル-2-O-ベンジル-3-メチルチオ-1, 2-プロパ

ンジオール (パート C、ステップ 1 および 2 のように調製) 1.0 g (1.75 mmol) を 120 ml のトルエンに溶解させた。この溶液に 4.30 g (22.0 mmol) の 6-ブロモヘキサン酸を添加し、溶液を 135 °C で 3 日間加熱した。次に茶色の溶液を室温まで冷却し、ロータリーエバポレイターで濃縮し茶色の油性残渣を得た。この残渣を 50 ml のクロロホルムに溶解させ、シリカ床を通して極端に極性の不純物を除去した。生じた溶液を 30 ml の飽和の塩化ナトリウム溶液で洗浄した。次にクロロホルム層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。硫酸マグネシウムの濾過による除去後、溶液を真空下に濃縮して黄色の油性残渣として粗生成物を得た。この粗生成物をシリカゲル 60 (E. メルク社、ドイツ) を用いるカラムクロマトグラフィーにより、100 ml のヘキサン、次に 10 ml のヘキサン中 10 % 酢酸エチル、最後にヘキサン中 30 % 酢酸エチルで連続的に溶出させて精製した。TLC (シリカゲル、ヘキサン中 30 % 酢酸エチル、 $R_f = 0.36$) で決定されたような生成物を含む分画をプールし、濃縮して

、低融点の黄色固体として収率40%でO B E C A T O Pのプロマイド塩を得た。

パートE：D o d m e c a pのプロマイド塩の合成

ステップ1. 1, 2-ジヘキサデシルオキシグリセリンのプロム化

100mlの丸底フラスコ中で1gの1, 2-ジヘキサデシルオキシグリセリンを80mlのトルエンに溶解させた。この溶液に1.84gの四臭化炭素と1.46gのトリフェニルホスフィンを添加した。反応混合物を室温下で24時間攪拌し、反応の進行を薄層クロマトグラフィー（ヘキサン中5%酢酸エチル）によってモニターした。

生じた黄色固体を濾過し、濾液をロータリーエバボレイターで濃縮し、アセトンに溶解させた。この段階を繰り返し、白色固体（収量900mg）の形で生成物を単離した。

ステップ2. 1, 2-ジヘキサデシルオキシ-3-ジメチルアミノグリセリンの形成

100mlの丸底フラスコ中で、900mgの3-ブロモ-1, 2-ジヘキサデシルオキシグリセリンを30mlのクロロホルムに溶解させた。720mgのジメチルアミンを約10倍モル過剰になるように添加し、反応混合物を室温下に

一夜攪拌した。反応の進行を薄層クロマトグラフィー（ヘキサン中30%酢酸エチル）で測定した。

反応混合物を分液ロートに移し、飽和塩化ナトリウム溶液で2回洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過した。濾液をロータリーエバボレイターで濃縮し、630mgの生成物を得た。

ステップ3：D o d m e c a pのプロマイド塩の形成

100mlの丸底フラスコ中で、ステップ2で得られた1, 2-ジヘキサデシルオキシ-3-ジメチルアミノグリセリン270mg、ブロモヘキサン酸0.628gおよび炭酸カリウム0.271gを80mlトルエンに溶解させた。反応混合物を油浴中で120°Cに加熱し、連続攪拌しつつ条件を一夜維持した。反応の進行は薄層クロマトグラフィー（ヘキサン中30%酢酸エチル）を用いてモニ

ターし、20時間で完全であることが示された。

次いで反応混合物をロータリーエバポレイターで濃縮した。白色残渣を30m lのクロロホルムに溶解させ、30m lの脱イオン水で分液ロートで3回洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過した。濾液をロータリーエバポレイターで濃縮し、アセトンで沈殿させて白色ワックス状の生成物が得られた（収量400mg）。

パートF：D o d m e h a pのプロマイド塩の合成

100m lの丸底フラスコ中で、パートE、ステップ2で得られた630mgの1, 2-ジヘキサデシルオキシー-3-ジメチルアミノグリセリンおよび1.83gのプロモヘキサノールを60m lのトルエンに溶解させた。反応混合物を連続攪拌しながら油浴で110°Cに加熱し、条件を3日間維持した。反応の進行は薄層クロマトグラフィー（ヘキサン中30%酢酸エチル）を用いてモニターし、3日後に完了したことが示された。

反応混合物をロータリーエバポレイターで濃縮した。残渣を30m lのクロロホルムに溶解させ、分液ロートで飽和の重炭酸ナトリウム水溶液で3回洗浄して抽出した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過した。濾液をロータリーエバポレイターで濃縮し、シリカゲル60充填カラム（イーエムサイエンス社、ギップスタウン、N J）で精製した。生成物はヘキサン中、酢酸エチル30%溶

液を用いて溶出させた。100%ヘキサンでスタートし、酢酸エチルの濃度を各連続洗浄で30%まで次第に増加させた。（生成物の収量：1. 25g）。

実施例II

D o m c a t o p-オリゴヌクレオチド（“リポヌクレオチド”）結合体の合成

パートA：D o m c a t o pのプロマイド塩のNHSエステルの合成

実施例1パートBで製造されたDOMCATOPのプロマイド塩（130mg、0.17mmol）を20m lの乾燥テトラヒドロフランに溶解させ、この溶液に65mg（0.56mmol）のN-ヒドロキシコハク酸イミドおよび116mg（0.56mmol）のジシクロヘキシルカルボジイミドを添加した。この溶液を室温で窒素下に20時間攪拌した。反応により生成したジシクロヘキシルウレアを

濾去し、濾液を減圧下に濃縮し、クロロホルムに溶解する残渣を得た。この溶液を飽和の重炭酸ナトリウムで抽出し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、量論的収量のDODMECAPのNHSエステルを得た。

パートB：5' -アミノ末端オリゴヌクレオチドの合成

SEQ. ID. NO. 1からなる5' -アミノ末端オリゴヌクレオチドの合成は、公知の標準的なホスホルアミダイト化学手順および商業的に入手可能な自動合成器を用いて行った。塩基アデノシン、グアノシン、シトシンおよびチロシンのシアノエチルホスホルアミダイトおよびアミノリンカーホスホルアミダイトから調節多孔ガラス固体支持体上で自動化合成を経てオリゴヌクレオチドを合成した。5' -アミノ末端オリゴヌクレオチドの合成の最後のステップにはアミノリンカーホスホルアミダイト（アプライドバイオシステム社、フォスター・シティ、CA）を用い、5' -アミノ末端オリゴヌクレオチドをカップリングさせた。ヌクレオシド塩基、O-シアノエチル基の脱保護、オリゴヌクレオチドの支持体との結合の切断は、水酸化アンモニウムで55°Cで少なくとも15時間処理することにより一段階で行った。生じたアンモニア性溶液を濃縮すると、5' -アミノ末端オリゴヌクレオチドが得られ、これを水に溶解し、引き続く使用まで保存した。

パートC：DomcapのNHSエステルと5' -アミノ末端オリゴヌク

レオチドのカップリングによるリポヌクレオチドの形成

パートBで製造されたホスホロチオエートオリゴヌクレオチド（300 μlの水中2.2 mg）に33 μlの3M酢酸ナトリウムおよび1 mlのエタノールを加えて-20°C、少なくとも1時間で沈殿させた。沈殿したオリゴヌクレオチドを4°Cで少なくとも30分間遠心分離して分離した。上清を除去し、オリゴヌクレオチドを含むペレットをスピード真空5分間で乾燥させ、490 μlの0.25MのHEPES溶液（pH 8.1）に溶解させた。この溶液に210 μlのピリジンおよび280 μlの25 mMチオカチオン性NHSエステルのピリジン液を加えた。生じた混合物をボルテックスし、55°Cで少なくとも18時間反応させた。溶液を10 mlのチューブに移し、280 μlの3M酢酸ナトリウム、7

0.0 μ l の水および 7.9 ml のエタノールで -20 °C で少なくとも 2 時間処理した。生じた懸濁液を 17,000 rpm、4 °C で 1 時間遠心分離し、上清を除去した。得られたオリゴヌクレオチド含有ペレットを乾燥させ、1 ml の水に溶解させた。この粗生成物を 0.1 M 酢酸アンモニウム (pH 7) 中增加するメタノール濃度勾配で C8 ラジアルパック (radial pak) カラムを使用する逆相 HPLC によって精製した。

リポヌクレオチドを含有する分画をプールし、濃縮して残渣を 1-2 ml の水に溶解させ、0.25 ml の 3 M 酢酸ナトリウムおよび 8 ml エタノールで -20 °C で一夜処理して、リポヌクレオチドのペレットを遠心分離して得た。

実施例III

リポソーム製剤の合成

後述のリポソーム製剤は示された量の DOP E (アバンチポーラーリピド社、アラバスター, AL) ; コレステロール (アバンチポーラーリピド社、アラバスター, AL) ; ビタミン D₃ (アルドリッヂケミカル社、ミルウォーキー, WI) ; オレイン酸 ("OA" ; ヌチェックプレプ社、エリシアン、MN) ; および上述のように製造された DODMECAP, DOMCATOP, DOMHYTOP, DODMECAP, OBEHYTOP および OBECASTOP を含んでいた。与えられた全割合はモル割合である。他に示さないかぎり、本明細書でリボン

ムの製造に用いられたカチオン性脂質：滴定可能な両親媒体：ステロールのモル割合は、10:5:2 である。“全脂質”の用語は上述のリポソームの全成分の合計である。下記のホスホチオエートオリゴヌクレオチドは SEQ. ID. NO. 1 で与えられる。

所望割合の全脂質の合計 80 μ モルをクロロホルムに溶解させ、乾燥させて、pH 7.4 の磷酸緩衝塩水でホスホチオエートオリゴヌクレオチドの 0.5 M 溶液を 1 ml 含む水溶液で再び水和させた。製造物をボルテックスし、37 °C で一夜振盪すると平衡に達し、小胞を形成し、次いで凍結-解凍した。これに続き、このように形成された多重ラメラリポソーム小胞を適当な孔のサイズのポリ

カーボネートフィルターを通して押し出し、単一の二重層を有するリポソームを得た。カプセル化されていない物質を除くため、リポソームをサイジングゲルカラムを通してゲル濾過した。カプセル化されたオリゴヌクレオチドの全量をハイブリダイゼイションプロテクションアッセイを用いて決定した。(Arnold 等, PCT WO 89/02476 参照)。

実施例IV

リポソーム製剤の細胞内取込み

10%牛胎児血清(ギブコBRL社、グランドアイランド、NY)を含んだ2mlのRPMI-1640培地(バイオホイットティカ社、ウォーカースビル、MD)中、全部で 2×10^6 細胞(U937細胞; ATCC、ロックビル、MD)を6-ウェルの組織培養プレートに播種し、5%CO₂中35°Cでインキュベートした。磷酸緩衝塩水(pH 7.4)に溶解されたリポソームにカプセル化されたまたはフリーのオリゴヌクレオチドの100nM溶液を細胞に導入した。48時間後、細胞を溶解し、実施例IIIに記載されたようにしてオリゴヌクレオチドの量を決定した。

実施例IIIに説明されたように製造し、オレイン酸およびビタミンD₃とともにカチオン性脂質DODMECAP、DODMEHAP、DOMCATOP、DOMHYTOP、OBETHYTOPまたはOBECATOPを含むリポソームは類似のオリゴヌクレオチド取込みを示した。

実施例V

ウイルス抑制検定

10%牛胎児血清を含んだRPMI-1640培地中、全部で 2.8×10^6 細胞(Jurkat細胞; ATCC)を2本の15mlチューブに全量10mlになるように加えた。細胞を遠心分離し、上清を静かに別の容器に移し、細胞を上述の培地1mlに再び懸濁させた。レトロウイルス(HIV-111B)の試料4.0mlを一本のチューブに添加し、培地のみ4.0mlを対照に添加した。細胞は2時間37°C、5%CO₂雰囲気でインキュベートした。フリーのウイルスは細胞から洗浄し、細胞は35mlの培地に再び懸濁した。

感染細胞および対照細胞を96ウェルの組織培養プレートに125μlのアリコートで播種した。実施例IIIに従って製造した種々の濃度のリポソームまたはフリーのオリゴヌクレオチドをウェルに添加し、プレートを5%CO₂霧囲気下37°Cで6日間インキュベートした。製造社説明書および対照を用いて、p24蛋白レベルを抗原捕獲検定(antigen capture assay)(クールターライムノロジー社、ヒアリー、FL; USP4, 886, 742)により決定した。結果を図1, 2および3に示す。ここで“—●—”はオリゴヌクレオチドを有するリポソームを表し、“—■—”はオリゴヌクレオチドを有しない対照リポソームを表し、“—▼—”はフリーのオリゴヌクレオチドを表す。

図1においては、オリゴヌクレオチドを有し、または有しないチオカチオン性脂質DOMCATOPを用いて製造されたリポソーム、またはオリゴヌクレオチド単独の結果を示す。ここに示されるとおり、オリゴヌクレオチドを含むリポソームは、p24レベルの有意の減少によって示されるように、ウイルスの複製を効果的に抑制した。

図2においては、アンモニウムイオンを含有する脂質DODMECAPの結果を示す。ここに示されるとおり、ウイルス複製の抑制は観察されなかった。

図3においては、アンモニウムイオン含有脂質DODMEHAPとステロールとしてビタミンD₃またはコレステロールを用いて製造されたリポソームの結果を表している。ここに示されるとおり、ビタミンD₃含有リポソームは、その

コレステロール含有等価物よりもウイルス複製の抑制に予想外により効果的であった。

実施例VI

細胞代謝活性検定

細胞の代謝活性に与える影響を決定するために、各種のリポソーム製剤の毒性の測定として、実施例Vからの感染細胞を用いてXTT検定を次のように行った。細胞培地中、1mg/mlのXTT(2,3-ビス[2-メトキシ-4-ニトロ-S-スルホフェニル]-2H-テトラゾリウム-S-カルボキシアニリド分子内塩；シグマケミカル社、セントルイス、MO)溶液を調製した。これに、X

TT溶液1mlにつき、5μlの5mMフェナジンメトスルフェート（シグマケミカル社）を添加した。得られた混合物の50μlのアリコートを各ウエルに添加し、プレートを5%CO₂雰囲気下、37℃で4時間インキュベートした。その後、各ウエルに15μlのトリトンX-100（シグマケミカル社）を加え、450-650nmの二重（dual）吸光度における光学密度（O. D.）を読んだ。補正後光学密度測定は、適当な対照レベルを減することにより決定した。

図4に示されるとおり、実施例IIIに記載されているようにして調製したリポソームの濃度を増加させると、アンモニウムイオン含有脂質（DODMEHAP）を有するリポソームは等価のスルホニウムイオン含有脂質（DOMHYTOP）を有するリポソームよりもはるかに低い濃度で毒性を示し始めた（光学密度の減少によって明らかなどおり）。

本発明の他の観点、用途および利点は、本開示を検討することにより当業者に明らかとなるであろう。当業者はまた、発明の精神から離れることなく、本明細書に開示された構成および方法に対する多くの変化が可能であることを認識するであろう。それ故下記クレームは本発明の範囲を示すものであり、明細書において上述した特定の形態に限定されるものではない。

【配列表】

配列番号1：

(i) 配列の特性：

- (A) 長さ：26 塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列：

CTTCGGGCCT GTCGGGTCCC CTCGGG

配列番号2：

(i) 配列の特性：

- (A) 長さ：26 塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列：

CCCGAGGGGA CCCGACAGGC CCGAAG

【図1】

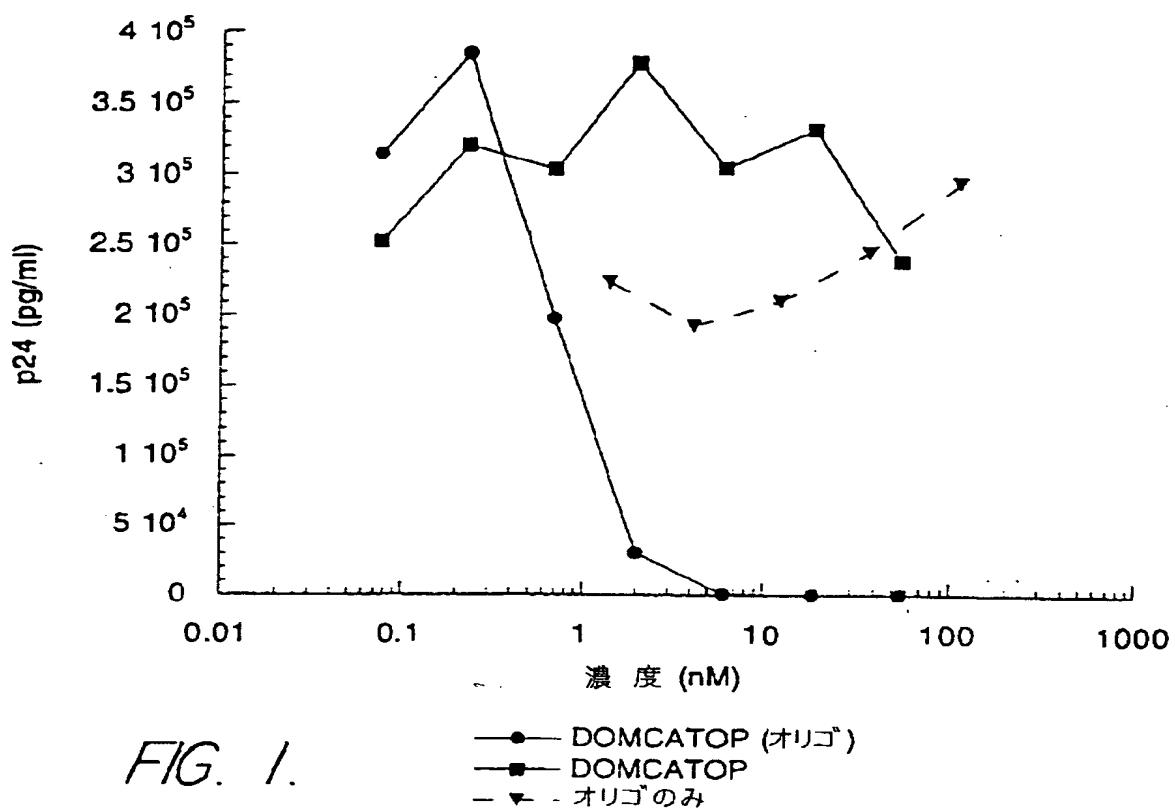


FIG. 1.

【図2】

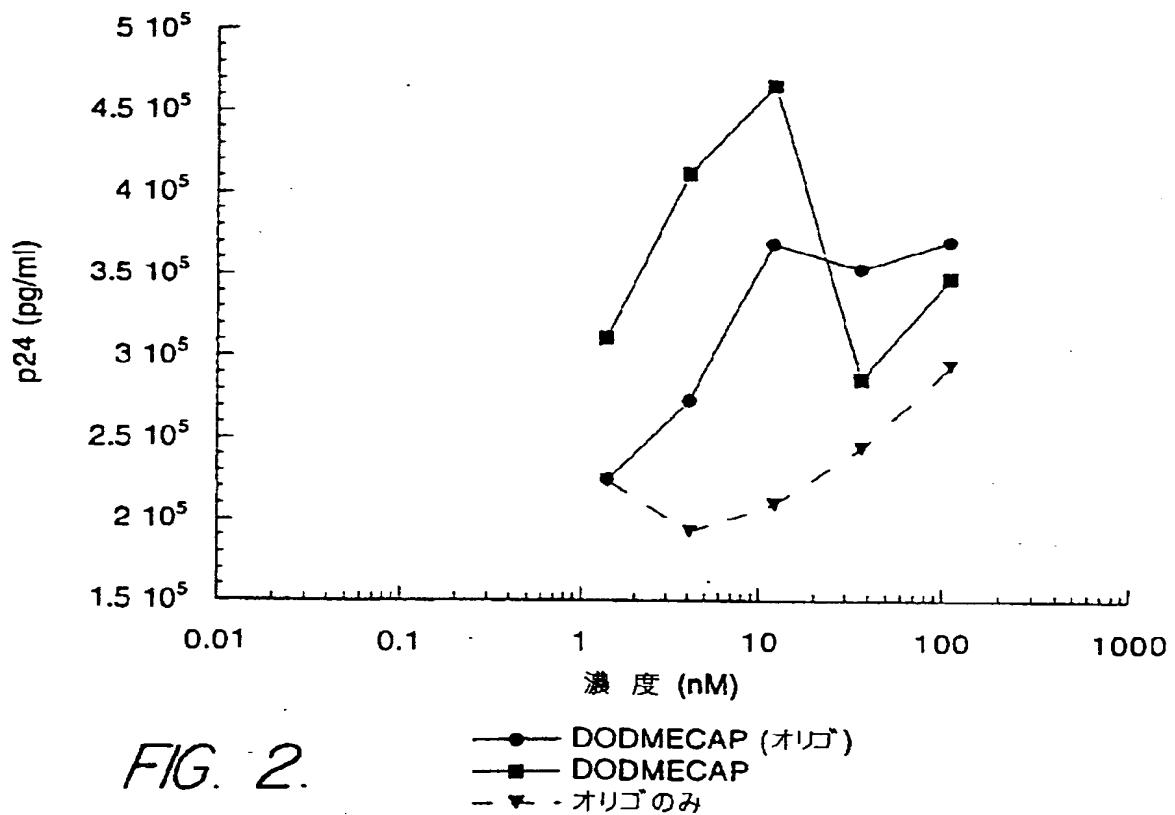


FIG. 2.

【図3】

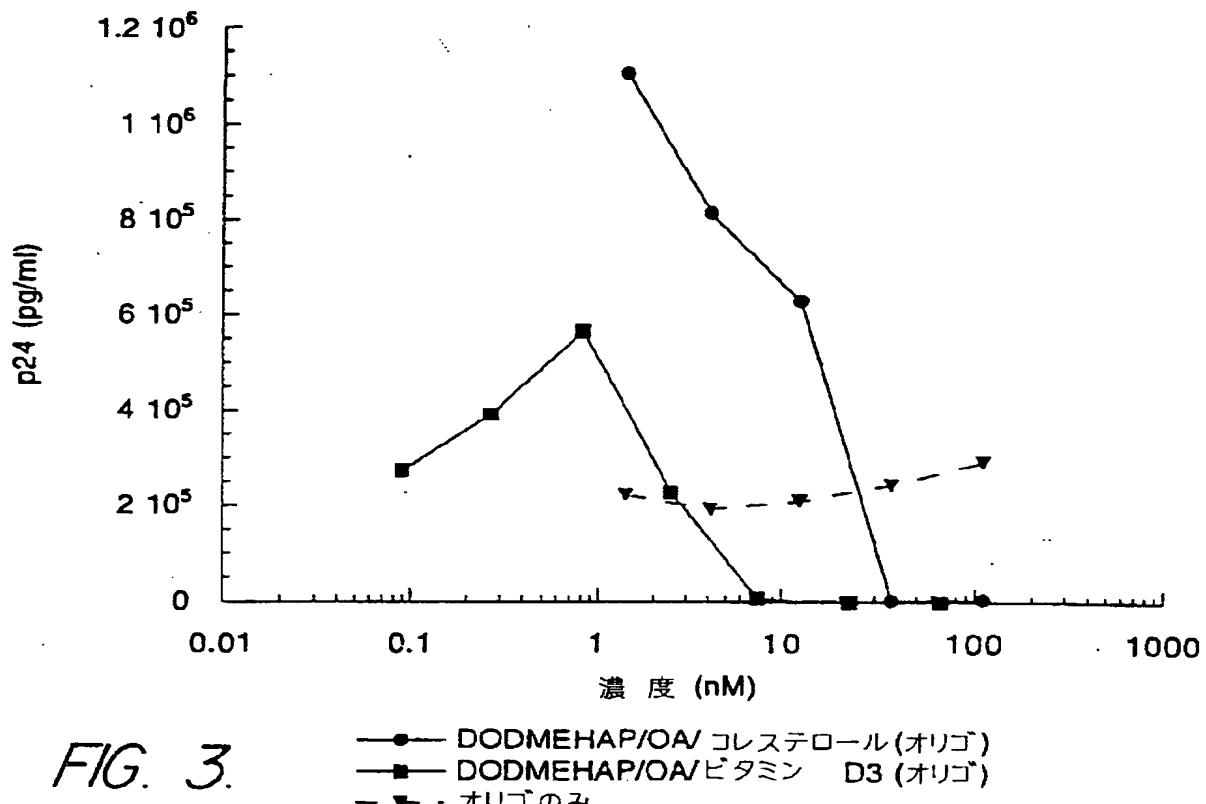


FIG. 3.

【図4】

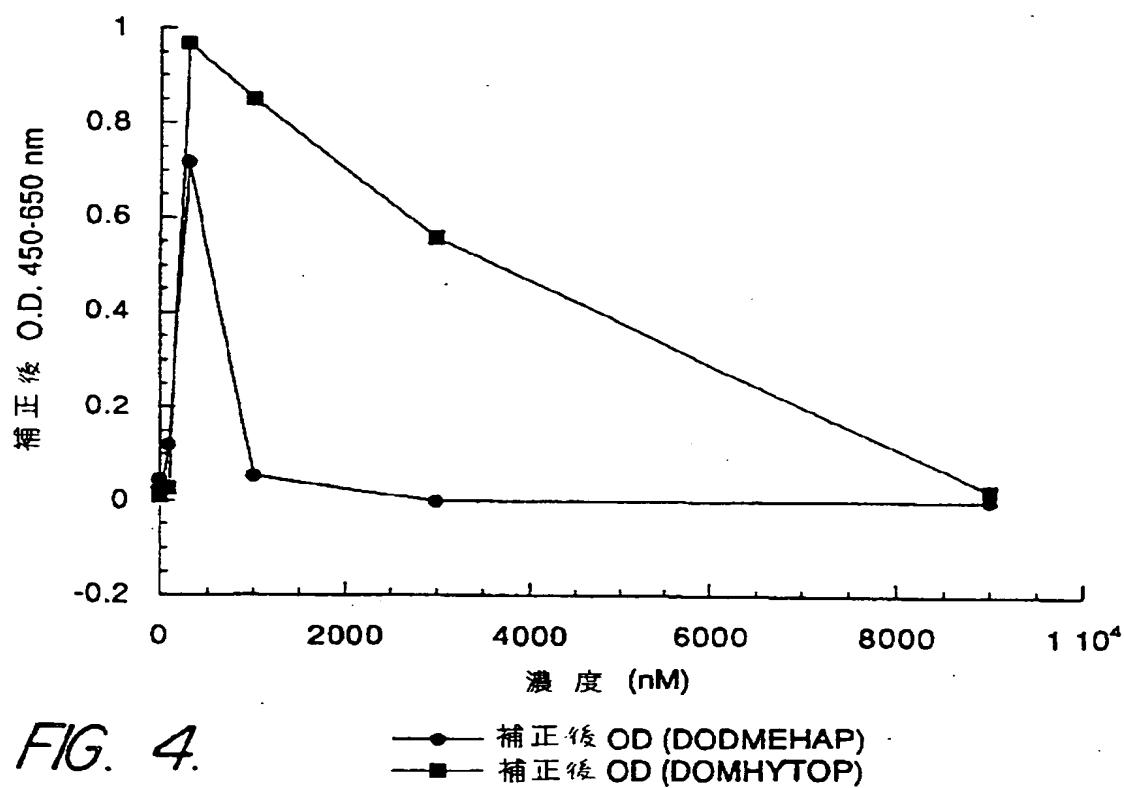


FIG. 4.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Int'l Application No PCT/US 96/07121
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 6 C07C381/12 A61P A61K47/48 C12N15/88 C07H21/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07C A61K C12N C07H		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. MED. CHEM., vol. 36, no. 14, 1993, pages 2018-2025, XP000196342 S.L. MORRIS-NATSCHKE ET AL: cited in the application see page 2024, compound 26 ---	1
A	WO 91 16024 A (VICAL INC) 31 October 1991 see claims 1, 12-14, 22, 23, 28, 36-45, 53, 54 & US 5 264 618 A cited in the application ---	1, 10, 11, 20, 21
		-/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
'E' earlier document but published on or after the international filing date		
'L' document which may throw doubt on priority claim(s) or which is used to establish the publication date of another citation; other special reason (as specified)		
'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
'Y' document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art		
'A' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 December 1996		Date of mailing of the international search report 14. 01. 97
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5000 Patentkantoor 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2044, Fax. 31 651 600 00 Fax. (+31-70) 340-3031		Authorized officer Van Amsterdam, L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte	ional Application No
PCT/US 96/07121	

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 90 10448 A (GENENTECH INC) 20 September 1990 see claims 1,2,14,33,34,37-39 --- J. MEMBRANE BIOL., vol. 72, 1983, pages 85-91, XP000196352 A. ELGAVISH ET AL: see the whole document ---	22,23, 32,34, 37,38, 47,48
A	BIOSC. REP., vol. 15, no. 1, 1995, pages 47-53, XP000196643 M.J. BENNETT ET AL: see page 50 - page 52 ---	50,51, 65,66
A	US 4 897 355 A (D.A. EPPSTEIN ET AL) 30 January 1990 cited in the application see examples 5,7-9,15 ---	50,51, 65,66
A	US 5 100 662 A (L.E. BOLCSAK ET AL) 31 March 1992 ---	
P,A	WO 95 17373 A (LIFE TECHNOLOGIES INC) 29 June 1995 see claims 1,13-19,21,22 -----	1,10,11, 20,21

Form PCT/ISA 210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 96/07121

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. Claims 1-49 and, in as far as they relate to sulfonium ion containing lipid, claims 50-79
2. Claims 50-79, in as far as they relate to ammonium containing lipid

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l Application No
PCT/US 96/07121

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9116024	31-10-91	US-A- 5264618 AU-A- 7854791 EP-A- 0523189 JP-B- 2538474 US-A- 5459127	23-11-93 11-11-91 20-01-93 25-09-96 17-10-95
WO-A-9010448	20-09-90	CA-A- 2049028 DE-D- 69008521 DE-T- 69008521 EP-A- 0462145 ES-T- 2055907 JP-T- 4503957	08-09-90 01-06-94 20-10-94 27-12-91 01-09-94 16-07-92
US-A-4897355	30-01-90	US-A- 5366737 US-A- 5545412 US-A- 5550289 US-A- 4946787 US-A- 5049386 US-A- 5208036 AU-B- 594654 AU-A- 5185386 CA-A- 1288774 EP-A- 0187702 JP-B- 6062517 JP-A- 61161246 JP-B- 2546623 JP-A- 7070011	22-11-94 13-08-96 27-08-96 07-08-90 17-09-91 04-05-93 15-03-90 17-07-86 10-09-91 16-07-86 17-08-94 21-07-86 23-10-96 14-03-95
US-A-5100662	31-03-92	AT-T- 119037 AU-B- 631377 CA-A- 1334165 CA-A- 1337332 DE-D- 68921389 DE-T- 68921389 EP-A- 0356339 EP-A- 0626169 ES-T- 2069600 JP-T- 4500203	15-03-95 26-11-92 31-01-95 17-10-95 06-04-95 29-06-95 28-02-90 30-11-94 16-05-95 16-01-92
WO-A-9517373	29-06-95	AU-A- 1437295	10-07-95

Form PCT ISA 210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inv.	Final Application No
PCT/US 96/07121	

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9517373	CA-A- 0741689 EP-A-	2179611 0741689	29-06-95 13-11-96

Form PCT/ISA-210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	F I
// C O 7 M 7:00		C 1 2 N 15/00
C 1 2 N 15/09	Z N A	Z N A A
(31) 優先権主張番号	0 8 / 4 8 0, 6 2 2	
(32) 優先日	1995年6月7日	
(33) 優先権主張国	米国 (U S)	
(31) 優先権主張番号	0 8 / 4 8 2, 3 0 5	
(32) 優先日	1995年6月7日	
(33) 優先権主張国	米国 (U S)	
(31) 優先権主張番号	0 8 / 4 8 2, 4 3 0	
(32) 優先日	1995年6月7日	
(33) 優先権主張国	米国 (U S)	
(31) 優先権主張番号	0 8 / 4 8 2, 4 9 7	
(32) 優先日	1995年6月7日	
(33) 優先権主張国	米国 (U S)	
(81) 指定国	A U, C A, J P, K R	
(72) 発明者	パテル, ジャズミン・アール アメリカ合衆国カリフォルニア州92131, サン・ディエゴ, スクリップス・ヴィス タ・ウェイ 10030-52	
(72) 発明者	ダス, アディティア・ランジャン アメリカ合衆国カリフォルニア州92122, サン・ディエゴ, アヴェニダ・ナヴィダッ ド 7867, アパートメント 241	